



УДК 577.159.02

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
РИБОНУКЛЕАЗЫ ИЗ ГРИБА *PENICILLIUM*
*BREVICOMPACTUM*Моисеев Г. П., Бочаров А. Л., Мамаева О. К.,
Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

С целью изучения механизма действия РНКазы *Pen. brevicomcompactum* исследованы зависимости константы скорости $k_{\text{кат}}$ и ее отношения к константе Михаэлиса $k_{\text{кат}}/K_m$ от pH в реакциях трансэтерификации фосфодиэфирной связи и гидролиза циклофосфатов. В качестве субстратов использовали динуклеозидфосфаты УрА, СрА и АрС и нуклеозидциклофосфаты У>р и С>р. Показано, что в ферментативной реакции, протекающей, наиболее вероятно, по механизму общего кислотно-основного катализа, участвуют две ионогенные группы белка с рК 3,42±0,06 и 5,61±0,06. В фермент-субстратных комплексах РНКазы с циклофосфатами рК этих групп увеличивается до значений 4,12±0,07 и 6,98±0,07 соответственно. Обнаружено, что константа скорости ферментативной реакции с участием динуклеозидфосфатов определяется двумя лимитирующими стадиями, одной из которых является стадия диссоциации комплекса фермент-продукт. Сделан вывод, что локализация фосфодиэфирной связи субстратов в активном центре РНКазы при образовании фермент-субстратного комплекса не зависит от природы гетероциклических оснований нуклеозидов на ее концах.

Изучение механизма действия пиримидинспецифичной и ряда гуанилспецифичных рибонуклеаз показало, что функциональная гомология этих ферментов сопровождается гомологией их активных центров [1-9]. В каталитическом участке рибонуклеаз имеются ионогенные группы, обеспечивающие механизм действия по типу общего кислотно-основного катализа. Определяющее влияние на каталитическое состояние этих групп оказывает связывание гетероциклических оснований нуклеотидов в контактном («узком») участке активного центра фермента [7, 8, 10].

Чрезвычайно полезным для понимания молекулярных основ специфичности действия рибонуклеаз представляется сравнительное изучение рибонуклеаз, проявляющих малую специфичность к химической природе нуклеозидов на концах гидролизуемой фосфодиэфирной связи. Тем не менее до последнего времени исследования механизма действия этих ферментов были немногочисленны. Наибольшее внимание с точки зрения изучения физико-химических и ферментативных свойств уделялось неспецифическим РНКазе T_2 из гриба *Aspergillus oryzae* [3, 11, 12] и РНКазе М из гриба *Asp. sailoi* [13-16].

В настоящее время разработаны методы крупномасштабного выделения и очистки неспецифической РНКазы (КФ 3.1.4.23) из гриба *Penicillium brevicomcompactum* [17], лабораторные методы выделения которой описаны в работах [18, 19]. РНКазы *Pen. brevicomcompactum* имеет молекулярную массу около 36 000 и содержит 323 аминокислотных остатка [20]. Она гидролизует РНК в ходе двухстадийного процесса, при котором в качестве промежуточного соединения образуется циклофосфат. Все синтетические полирибонуклеотиды являются ее субстратами. Хорошими субстратами являются также динуклеозидфосфаты [20]. Исследование РНКазы *Pen. brevicomcompactum* показало, что она катализирует не только расщепление, но и синтез 3'→5'-фосфодиэфирной связи, однако pH-оптимум реакций синтеза и гидролиза заметно различаются [21].

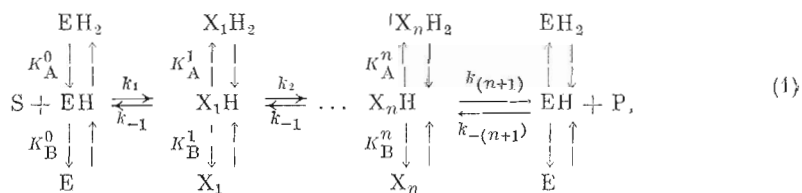
С целью изучения механизма действия этого фермента в данной работе методами стационарной кинетики определены ионогенные группы РНКазы,

участвующие в реакциях трансэтерификации фосфодиэфирной связи и гидролиза циклофосфатов. Для этого изучена зависимость в соответствующих реакциях параметров $k_{\text{кат}}$ и K_m от рН. В качестве субстратов при исследовании стадии образования циклофосфатов использовались динуклеозидфосфаты УрА, СрА и АрС, а для реакции гидролиза циклофосфатов — $U > p$ и $C > p$. Выбор нескольких субстратов с пиримидиновыми и пуриновыми нуклеозидами на 3'- и 5'-концах фосфодиэфирной связи позволял определить, фиксируется ли фосфодиэфирный фрагмент динуклеозидфосфатов различной природы в одном и том же локусе активного центра, или место его фиксации зависит от природы нуклеозидов на его концах. Кроме того, указанный набор субстратов давал возможность выявить влияние ионизации оснований на кинетические параметры ферментативной реакции.

Измерения $k_{\text{кат}}$ и K_m были выполнены в диапазоне рН от 3,5 до 7,5. Нижнее значение рН определялось устойчивостью РНКазы к денатурации. Наибольшее значение использованных рН лимитировалось уменьшением скорости реакции.

Известно, что зависимость отношения $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН отражает ионизацию групп свободного фермента, которые принимают участие в образовании комплекса Михаэлиса и/или каталитическом акте, и свободного субстрата, если его ионизация влияет на кинетические параметры реакции, а зависимость $k_{\text{кат}}$ от рН — ионизацию групп фермент-субстратного комплекса [22, 23]. Графики зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ и $k_{\text{кат}}$ от рН для всех субстратов представляли собой колоколообразные кривые (рис. 1, 2), показывая, что скорость реакций зависит от состояния ионизации кислых и основных групп фермента.

Простейшая схема, описывающая колоколообразную зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ или $k_{\text{кат}}$ от рН, может быть записана в виде:



где K_A^j и K_B^j — константы диссоциации протонов, EH_i и X_jH_i — формы свободного фермента и фермент-субстратного комплекса на различных стадиях реакции.

Представленному механизму соответствуют следующие выражения, определяющие зависимость $k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН [22]:

$$k_{\text{кат}} = \frac{\bar{k}_{\text{кат}}}{1 + [\text{H}^+]/K_A^* + K_B^*[\text{H}^+]}, \quad (2)$$

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_m} = \frac{\bar{k}_{\text{кат}}/\bar{K}_m}{1 + [\text{H}^+]/K_A^0 + K_B^0/[\text{H}^+]}, \quad (3)$$

где K_A^0 и K_B^0 — константы кислотной диссоциации свободного фермента, K_A^* и K_B^* — кажущиеся константы диссоциации фермент-субстратного комплекса, $\bar{k}_{\text{кат}}$ и \bar{K}_m — не зависящие от рН константа скорости и константа Михаэлиса, $[\text{H}^+]$ — концентрация водородных ионов.

Кинетические и ионизационные параметры, характеризующие зависимости $k_{\text{кат}}/K_m$ и $k_{\text{кат}}$ от рН и вычисленные в соответствии со схемой 1, даны в табл. 1. Анализ экспериментальных данных по схемам, учитывающим влияние двух ионогенных групп на восходящую или на нисходящую ветви колоколообразных кривых зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ и $k_{\text{кат}}$ от рН [24], не приводил к уменьшению суммы среднеквадратичных отклонений экспериментальных и теоретических данных. Это означает, что определяющее влияние на зависимость кинетических параметров рассматриваемых реакций от рН оказывают две ионогенные группы, одна из которых находится в депротонированной, а другая в протонированной форме.

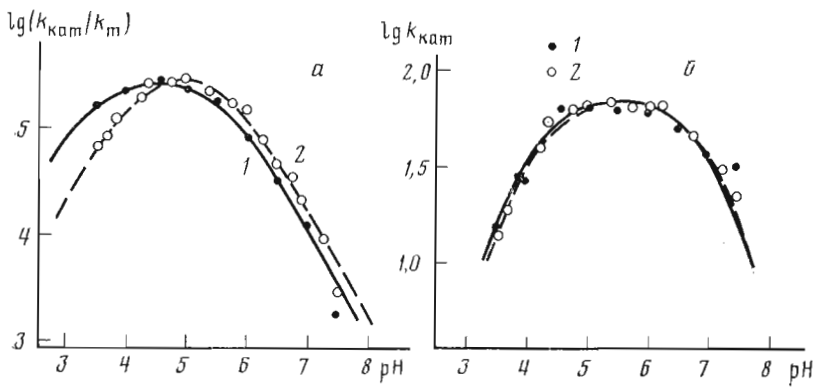


Рис. 1. Зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ (а) и $k_{\text{кат}}$ (б) от рН в реакции гидролиза $U > p$ (1) и $C > p$ (2) РНКазой *Pen. brevicompactum*

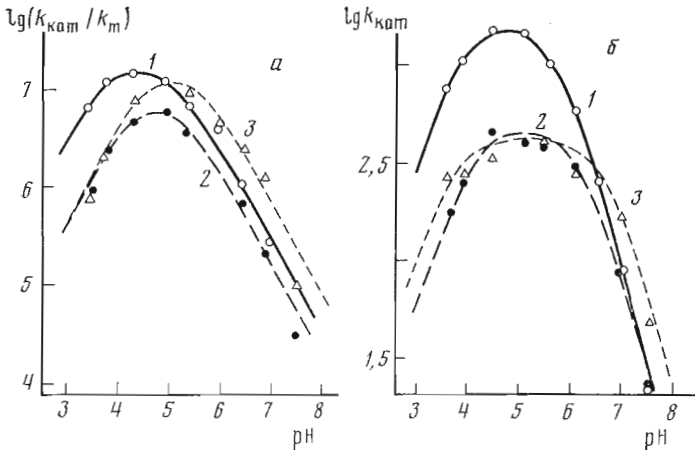


Рис. 2. Зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ (а) и $k_{\text{кат}}$ (б) от рН в реакции трансэтерификации фосфодиэфирной связи UrA (1), CpA (2) и ApC (3) при действии РНКазы *Pen. brevicompactum*

Сравнение кинетических параметров $k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_m$ реакций гидролиза $U > p$ и $C > p$ показывает, что константы скоростей для обоих циклофосфатов идентичны, а различия в константах Михаэлиса составляют около 30%. Таким образом, различие в химической природе оснований этих субстратов проявляется лишь в несколько большем средстве к РНКазе *Pen. brevicompactum* цитозинового производного. Значения pK групп, определяющих щелочные ветви зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ для $U > p$ и $C > p$, практически совпадают. Это свидетельствует о том, что в обоих случаях в реакции участвует одна и та же группа фермента, значение pK которой составляет $5,62 \pm 0,07$. Однако pK групп, определяющих восходящие ветви колоколообразных зависимостей $k_{\text{кат}}/K_m$ от рН, различаются. В случае $U > p$ соответствующее значение pK равно $3,42 \pm 0,06$. Для $C > p$ величина pK группы, определяющей восходящую ветвь, равна $4,23 \pm 0,03$. Это значение близко к величине pK , характерного для протонирования цитозинового основания [25]. По-видимому, восходящая ветвь колоколообразной кривой для $C > p$ определяется двумя группами с pK 3,42 и 4,23, одна из которых принадлежит белку, а вторая — субстрату. Это подтверждается совпадением констант ионизации кислых и щелочных групп для обоих циклофосфатов в фермент-субстратном комплексе (табл. 1). В этом случае, когда кривая определяется ионизацией групп с pK 3,42 и 4,23, проведенный анализ мог выявить только группу 4,23, pK которой на 0,8 единицы рН превышает pK второй группы, так как возрастающая ветвь колоколообразной зависимости ограничена относительно небольшими изменениями $k_{\text{кат}}/K_m$ между их максимальным значением при рН 4,7 и значением при рН 3,5. Можно заклю-

Кинетические параметры реакции гидролиза $U > p$ и $C > p$ и реакции трансэтерификации $UрА$, $СрА$ и $АрС$ РНКазой *Pen. brevicompactum*

| Субстрат | $\bar{k}_{кат}/\bar{K}_m \cdot 10^{-6}$, с ⁻¹ М ⁻¹ | pK_A | pK_B | $\bar{k}_{кат}$, с ⁻¹ | pK_A^* | pK_B^* | \bar{K}_m , мМ |
|----------|--|-----------|-----------|--------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|
| $U > p$ | 0,3 | 3,42±0,06 | 5,58±0,03 | 74 | 4,10±0,05 | 6,95±0,05 | 245 |
| $C > p$ | 0,39 | 4,23±0,03 | 5,65±0,03 | 74 | 4,17±0,03 | 7,01±0,03 | 190 |
| $UрА$ | 2,2 | 3,88±0,09 | 5,10±0,06 | 1660 | 3,60±0,03 | 5,72±0,02 | 76 |
| $СрА$ | 9,6 | 4,37±0,10 | 5,23±0,09 | 500 | 3,84±0,05 | 6,23±0,03 | 52 |
| $АрС$ | 8,6 | 4,61±0,07 | 5,65±0,07 | 260 | 3,46±0,10 | 6,72±0,06 | 30 |

чить, что ионизация цитидинового основания приводит к ухудшению связывания субстрата с ферментом и в фермент-субстратном комплексе цитозинное основание субстрата находится в неионизованном состоянии.

Таким образом, в реакции гидролиза циклофосфатов участвуют две ионогенные группы белка, одна из которых находится в депротонированном, а вторая — в протонированном состоянии. Значения pK этих групп в свободном ферменте и в фермент-субстратном комплексе позволяют считать, что одной из этих групп является боковая цепь остатка дикарбоновой кислоты, а второй — гистидинового остатка.

Константы ионизации ионогенных групп, найденные из зависимостей $k_{кат}/K_m$ от pH реакции трансэтерификации фосфодиэфирной связи, для $UрА$, $СрА$ и $АрС$ заметно различаются между собой. Это различие наблюдается также и для значения их pK в фермент-субстратных комплексах. Характерно, что величины pK групп, характеризующих восходящие ветви зависимостей $k_{кат}/K_m$ от pH , близки к значениям pK ионизации аденинового и цитозинового основания. Так, для $UрА$ это значение pK равно 3,88±0,09, тогда как pK ионизации аденинового основания в 3'-АМР составляет 3,7 [26]. В случае $СрА$ наблюдаемое значение pK равно 4,37±0,1, т. е. близко к pK ионизации цитозинового основания. По причинам, отмеченным выше, если соответствующая ветвь pH зависимости $k_{кат}/K_m$ определяется ионизацией группы белка с $pK \sim 3,4$, аденозинового основания с $pK \sim 3,7$ и цитозинового основания с $pK \sim 4,3$, экспериментально можно выявить лишь значение, наиболее близкое к pH -оптимуму зависимости $k_{кат}/K_m$, т. е. $pK \sim 4,3$. То же самое можно отметить и для $АрС$.

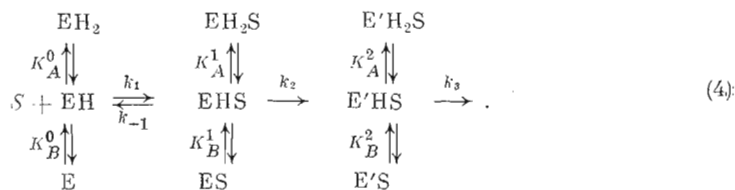
В фермент-субстратных комплексах указанных динуклеозидфосфатов соответствующие pK равны 3,64±0,2. Таким образом, как и в случае циклофосфатов, можно полагать, что восходящие ветви pH -зависимостей $k_{кат}/K_m$ для динуклеозидфосфатов определяются влиянием ионизации оснований нуклеозидов, расположенных на концах фосфодиэфирной связи. Другими словами, ионизация оснований указанных нуклеозидов влияет на их связывание с РНКазой. Вместе с тем из принципа детального равновесия можно считать, что в реакции субстратов $UрА$ и $СрА$ участвует та же самая группа белка, что и в случае гидролиза $U > p$ и $C > p$, с pK 3,42±0,06. Близость величин pK кислой группы в фермент-субстратных комплексах $UрА$, $СрА$ и $АрС$ позволяет предположить, что эта же группа белка участвует и в случае субстрата $АрС$.

Нисходящие ветви зависимостей $k_{кат}/K_m$ от pH для трех динуклеозидфосфатов определяются ионизацией групп, различие pK которых достигает 0,5 единицы pH . Только для $АрС$ значение pK 5,65±0,07, характеризующее нисходящую ветвь, практически совпадает с ранее найденным значением pK в реакции гидролиза циклофосфатов. Соответствующие pK для $UрА$ и $СрА$ равны 5,10±0,06 и 5,23±0,09. Аналогичные различия наблюдаются и для pK групп, характеризующих зависимость $k_{кат}$ от pH . Так, для $АрС$ pK группы, определяющей нисходящую ветвь зависимости $k_{кат}$ от pH , равно 6,72±0,06, а для $UрА$ — 6,23±0,03 и 5,72±0,02 соответственно. Видно, что разница между pK щелочной ветви зависимости $k_{кат}$ от pH

циклофосфатов и динуклеозидфосфатов увеличивается по мере возрастания $\bar{k}_{кат}$ последних (табл. 1).

В работах [27–29] было показано, что в ряду субстратов одного и того же фермента могут наблюдаться различия в pK групп, относящихся к свободному ферменту и фермент-субстратному комплексу, пропорциональные $\bar{k}_{кат}$, если при изменении рН изменяется стадия, лимитирующая скорость реакции.

Пусть в рН-оптимуме реакции, представленной схемой 1, трансформация комплекса X_mH в $X_{m+1}H$ является лимитирующей стадией, а по мере протонирования или депротонирования некоторого последующего комплекса X_pH лимитирующей стадией становится его переход к $X_{p+1}H$. В этом случае схему 1 можно упростить до следующей:



Константа скорости реакции, представленной схемой 4, равна:

$$k_{кат} = \frac{k_2 k_3 (k_2 + k_3)}{1 + \frac{k_2}{k_2 + k_3} \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_A^2} + \frac{K_B^2}{[\text{H}^+]} \right) + \frac{k_3}{k_2 + k_3} \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_A^1} + \frac{K_B^1}{[\text{H}^+]} \right)}. \quad (5)$$

Для субстратов, у которых $k_3 \ll k_2$, выражение 5 аналогично уравнению 2 и колоколообразная зависимость $k_{кат}$ от рН описывается константами ионизации комплекса $\text{E}'\text{HS}$, т. е. K_A^2 и K_B^2 . Если же $k_3 \gg k_2$, то наблюдаемые значения $K_A^{набл}$ и $K_B^{набл}$ отличаются от K_A^2 и K_B^2 . Это различие зависит от соотношения констант скоростей k_2 и k_3 и констант ионизаций комплексов EHS и $\text{E}'\text{HS}$. При $pK_A^2 < pK_A^1$

$$pK_A^{набл} = pK_A^2 - \lg \frac{k_2 + k_3}{k_2} \quad (6)$$

и

$$pK_B^{набл} = pK_B^2 + \lg \frac{k_2 + k_3}{k_2}. \quad (7)$$

Наблюдаемая величина pK' группы уменьшается, если она должна быть непротонирована для активной формы комплекса $\text{E}'\text{HS}$, и наоборот, ее значение возрастает, если в комплексе $\text{E}'\text{HS}$ она находится в протонированном состоянии. Если $K_A^1 = K_A^2$ или $K_B^1 = K_B^2$, то $pK_A^{набл} = pK_A^2$

и $pK_B^{набл} = pK_B^2$ соответственно.

Для зависимости $k_{кат}/K_m$ изменение наблюдаемых величин констант ионизации при смене лимитирующей стадии реакции происходит, если для константы диссоциации фермент-субстратного комплекса выполняется условие $k_{-1} \ll k_2$ [29]. Согласно [29], это изменение равно:

$$pK_A' = pK_A^0 - \lg \left(\frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-1}} \right) \quad (8)$$

$$pK'_B = pK_B^0 + \lg \left(\frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-1}} \right), \quad (9)$$

где K'_A и K'_B — наблюдаемые значения констант ионизации, определяющие зависимость $k_{кат}/K_m$ от pH.

Отмеченные выше различия в константах ионизации свободного фермента и фермент-субстратных комплексов, найденные из pH-зависимостей

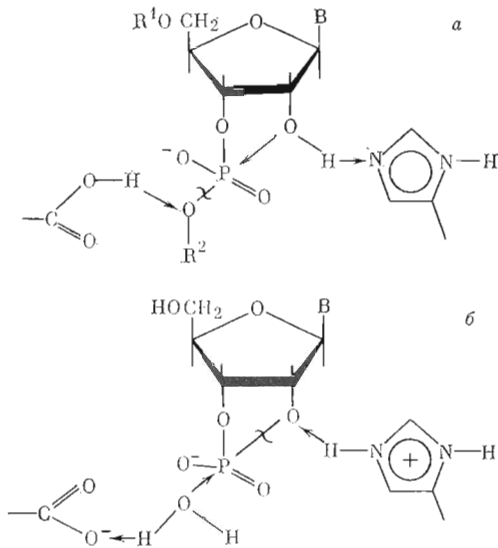


Рис. 3. Схематическое представление механизма действия РНКазы *Pen. brevicompactum* в реакциях трансэтерификации (а) и гидролиза циклофосфатов (б)

кинетических параметров гидролиза динуклеозидфосфатов, могут рассматриваться как следствие изменения лимитирующей стадии реакции для УрА и СрА. В этом случае можно сделать вывод, что активной формой фермента в реакции трансэтерификации является форма, содержащая непротонированное имидазольное кольцо гистидинового остатка и протонированную карбоксильную группу остатка глутаминовой или аспарагиновой кислот, т. е. гистидиновый остаток выступает в роли общего основания, а остаток дикарбоновой кислоты — в роли общей кислоты, которая протонирует уходящую группу. В силу обратимости трансферазного этапа реакции, подтверждаемой наличием синтетазной активности РНКазы *Pen. brevicompactum* [21], можно считать, что на стадии гидролиза циклофосфатов карбоксильная группа в ионизованном состоянии активирует атаку молекулы воды по механизму общего основного катализа, а гистидиновый остаток является кислотным катализатором, протонирующим уходящую группу. Аналогичный механизм с участием двух гистидиновых остатков принят в настоящее время для действия пиримидинспецифичной РНКазы А [4]. На стадии циклизации один из гистидиновых остатков РНКазы А (гистидин-12) выступает в роли общего основного катализатора, а другой (гистидин-119) — в роли общей кислоты. На стадии гидролиза остаток гистидина-119 активирует атаку воды по механизму общего основного катализа, а остаток гистидина-12 является кислотным катализатором, протонирующим уходящую группу. По аналогии с механизмом действия РНКазы А действие РНКазы *Pen. brevicompactum*, базирующееся на указанной выше роли остатка дикарбоновой кислоты и гистидинового остатка, можно представить схемой, приведенной на рис. 3.

Изменения наблюдаемых констант ионизации свободного фермента при переходе от реакции гидролиза $U \rightarrow p$ и $C \rightarrow p$ к реакции трансэтерификации фосфодиэфирной связи динуклеозидфосфатов позволяют оценить константы скоростей диссоциации фермент-субстратных комплексов k_{-1} . Вместе с экспериментально определяемыми величинами K_m это позволяет рассчитать константы скоростей образования фермент-субстратных комплексов. Однако, как можно видеть из выражений 8 и 9, для нахождения k_{-1} необходимо знать значения k_2 . Вместе с тем измеряемые величины $k_{кат}$ представляют собой комбинацию констант k_2 и k_3 . Для оценки k_2 мы использовали выражение 6. Величина pK_A^2 была принята равной 6,72, найденной для константы ионизации фермент-субстратного комплекса АрС, так как для этого субстрата, как отмечалось, по-видимому, отсутствует смена лимитирующей стадии реакции. Рассчитанные таким обра-

Константы скоростей отдельных стадий реакции
 трансэтерификации динуклеозидфосфатов УрА и СрА,
 представляемой схемой 4

| Субстрат | $k_1 \cdot 10^{-7},$ $c^{-1} M^{-1}$ | k_{-1}, c^{-1} | k_2, c^{-1} | $k_3 \cdot 10^{-3}, c^{-1}$ |
|----------|---|------------------|---------------|-----------------------------|
| УрА | 3,5 | 850 | 1840 | 16,6 |
| СрА | 2,6 | 540 | 720 | 1,6 |

зом константы скоростей элементарных стадий ферментативной реакции даны в табл. 2. Возникает вопрос: почему экспериментально наблюдается изменение констант ионизации только щелочной группы фермента для субстратов УрА и СрА, а изменение рК кислой группы в фермент-субстратном комплексе отсутствует? Очевидно, что депротонирование комплекса E'HS не приводит к заметному уменьшению скорости реакции. По-видимому, стадия трансформации этого комплекса является стадией диссоциации фермента и продукта. Действительно, одним из продуктов реакции трансэтерификации, для которого можно ожидать наименьшей скорости диссоциации, является нуклеозидциклофосфат. Как следует из приведенных выше заключений об активной форме фермента при гидролизе циклофосфатов, наименьшая скорость диссоциации комплекса фермент — нуклеозидциклофосфат достигается при протонировании остатка гистидина активного центра. Поэтому протонирование комплекса E'HS, наиболее вероятно являющегося комплексом фермент — продукт, будет приводить к уменьшению скорости его диссоциации. Состояние же ионизации карбоксильной группы активного центра, по-видимому, в существенно меньшей мере влияет на прочность этого комплекса. В пользу приведенного заключения о природе комплекса E'HS свидетельствует также то, что отношения величин k_3 , найденных для УрА и СрА (табл. 2), к ожидаемой для циклофосфатов величине $k_1 \sim 10^8 c^{-1} M^{-1}$ по порядку величины близки к экспериментальным значениям K_m для $U > p$ и $C > p$.

Таким образом, можно считать, что константа скорости ферментативной реакции под действием РНКазы *Pen. brevicompactum* для динуклеозидфосфатов, равная $k_{кат} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$, определяется константой скорости образования продукта k_2 и константой скорости диссоциации комплекса фермент — продукт k_3 .

Следующий вопрос, который может быть поставлен: почему при одинаковом положении фосфодиэфирного фрагмента динуклеозидфосфатов УрА, СрА и АрС относительно групп каталитического участка активного центра РНКазы константы скоростей реакции циклизации $k_{кат}$ для них различны? Скорее всего, это различие обусловлено влиянием природы основания нуклеозида на 3'-конце фосфодиэфирной связи на нуклеофильность его 2'-ОН-группы. Изучение скоростей гидролиза в двух сериях динуклеозидфосфатов НрА и НрС (где N — А, G, C, U) в растворах при рН 1 и 12,2, катализируемого двуокисью свинца, показало, что они изменяются для различных оснований в следующем порядке: $Ura > Cyt > Gua > Ade$ при рН 12,2 и $Ura > Cyt > Ade > Gua$ при рН 1 [30]. Эта закономерность влияния оснований на скорость гидролиза динуклеозидфосфатов в растворе находится в соответствии с соотношением констант скоростей ферментативного гидролиза $k_{кат}$ для УрА, СрА и АрС.

Представляется интересным выяснить, изменяется ли скорость лимитирующей стадии при изменении рН для специфических РНКаз. Анализ зависимостей K_m^{-1} от рН для РНКазы А при использовании в качестве субстратов СрА, УрА, СрУ, УрУ и $U > p$ [30–32] позволяет отметить, что для указанных субстратов наблюдается тенденция понижения рК группы, определяющей восходящую ветвь колоколообразной кривой и повышения рК группы, отвечающей нисходящей ветви, при возрастании $K_{кат}$. Наиболее вероятно, что это явление отражает наличие двух лимитирующих стадий ферментативного процесса, сменяющих одна другую при

изменении pH. Аналогичную картину можно наблюдать и для РНКазы T₁. Так, для щелочных ветвей зависимостей $k_{кат}/K_m$ от pH для GrC и GrU, $k_{кат}$ которых равно 350 и 38 с⁻¹, рК были найдены равными 7,7 и 7,3 соответственно [35]. Для тех же субстратов рК фермент-субстратных комплексов равны 8,8 и 8,3 [33].

Таким образом, можно полагать, что существование двух стадий, лимитирующих константу скорости ферментативной реакции, одна из которых, по-видимому, связана с процессом диссоциации продукта и фермента,— общее явление как для неспецифических, так и для специфических рибонуклеаз.

Экспериментальная часть

Гомогенный препарат РНКазы *Pen. brevicompactum* готовили путем дополнительной очистки хроматографией по методу [19] препаратов фермента, полученных путем крупномасштабного выделения из гриба *Pen. brevicompactum* в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР [17]. Циклофосфаты U>р и С>р получали циклизацией смеси 2'- и 3'-фосфатов дициклогексилкарбодимидом по методу, описанному в работе [34].

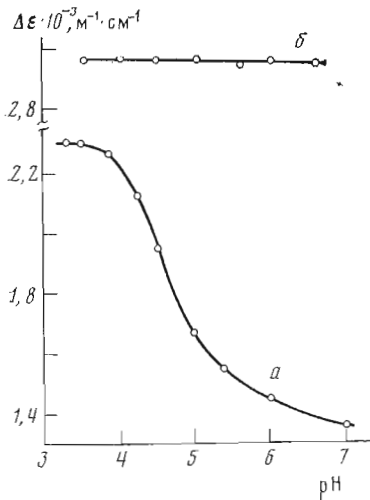


Рис. 4. Зависимость от pH разности молярных коэффициентов поглощения С>р и 3'-СМР (а), АрС и продуктов его гидролиза (б)

Полученные циклофосфаты хроматографировали на ДЕАЕ-целлюлозе (НСОО-форма) в градиенте NH_4HCO_3 . Затем аммонийные соли подвергали лиофилизации. Хроматографически чистые динуклеозидфосфаты УрА, СрА и АрС были любезно предоставлены В. Я. Флорентьевым (Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва). Для определения концентрации субстратов использовались следующие коэффициенты молярного поглощения: С>р— ϵ_{268} 8400 M⁻¹ см⁻¹, pH 7 [25], U>р— $\epsilon_{258,5}$ 9570 M⁻¹ см⁻¹, pH 7 [35], СрА— ϵ_{265} 21 000 M⁻¹ см⁻¹, pH 5,5, УрА— ϵ_{261} 23 500 M⁻¹ см⁻¹, pH 5,5, и АрС— ϵ_{268} 19 000 M⁻¹ см⁻¹, pH 5,5 [13].

При кинетических измерениях использовали стандартный буферный раствор, содержащий 0,05 М трис, 0,05 М ацетат натрия и 0,1 М NaCl. Исходные вещества для приготовления буфера были марки

ос.ч. Растворы готовили на деионизированной воде. Необходимое значение pH устанавливали добавлением уксусной кислоты. Величину pH измеряли комбинированным электродом GK2401C (Radiometer, Дания) на pH-метре pH-340 (СССР). Калибровку электрода проводили по стандартным буферным растворам с pH 4,01 и 7,00 (Radiometer) при 25° С.

Начальные скорости реакций определяли по изменению оптической плотности при 268 нм для АрС и 286 нм для остальных субстратов на спектрофотометре Cary-118 (Varian, США). Ширину оптической щели устанавливали равной 0,5 мм. Использовали кюветы с длиной оптического пути 0,2 и 1 см. Кюветы термостатировали при 25° С. При измерениях концентрации субстрата и фермента варьировали в диапазонах: $2,7 \cdot 10^{-9}$ — $1,1 \cdot 10^{-7}$ М РНКазы и $6,5 \cdot 10^{-5}$ — $4,1 \cdot 10^{-3}$ М субстрата при измерениях с U>р и С>р, $2,2 \cdot 10^{-10}$ — $2,6 \cdot 10^{-8}$ М РНКазы и $2 \cdot 10^{-5}$ — $1,5 \cdot 10^{-3}$ М субстрата при измерениях с УрА, СрА и АрС.

При каждом значении pH определение начальных скоростей проводили для девяти значений концентрации субстрата, при этом для низких концентраций субстрата измерения повторяли дважды. При расчете скоростей гидролиза С>р использовали разностные коэффициенты поглощения $\Delta \epsilon_{266}$, величины которых при различных pH были измерены следую-

щим способом. Часть раствора $C > p$ в воде в концентрации 10^{-3} М была использована для проведения исчерпывающего гидролиза РНКазой *Pen. brevicompactum* при рН 7. Концентрация фермента при этом составляла $\sim 10^{-6}$ М. Полноту гидролиза контролировали хроматографически. Затем одинаковые аликвоты исходного раствора циклофосфата и раствора, содержащего продукт, добавляли к буферным растворам с различным рН и регистрировали разностный спектр. Найденные таким способом $\Delta \epsilon_{286}$ для $C > p$ в зависимости от рН даны на рис. 4. Ошибка в измерении $\Delta \epsilon_{286}$, связанная с присутствием РНКазы в растворе гидролизата, не превышала 2%. Эти же значения $\Delta \epsilon_{286}$ использовали при расчете $k_{\text{кат}}$ для динуклеозидфосфата СрА. Значения $\Delta \epsilon_{286}$ для $U > p$ при различных рН были взяты из работы [35]. Соответствующие величины $\Delta \epsilon_{286}$ для УрА были приняты равными значениям, измеренным для $U > p$. Для АрС величины $\Delta \epsilon_{286}$ при различных рН измерены так же, как и для $C > p$, и приведены на рис. 4.

При расчете $k_{\text{кат}}$ и K_m использовали машинную программу, основанную на минимизации суммы среднеквадратичных отклонений. Для расчета $\bar{k}_{\text{кат}}$, $\bar{K}_{\text{кат}}/\bar{K}_m$ и рН в соответствии с уравнениями 2 и 3 использовали программу, в которой минимизацию суммы среднеквадратичных отклонений проводили с учетом статистического веса измерений при каждом значении рН, определяемого ошибкой измерений. Для расчетов использовали настольную ЭВМ Hewlett-Packard 9830 (США).

Авторы выражают благодарность В. А. Ежову (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино) за предоставление препарата РНКазы *Pen. brevicompactum*, В. Л. Флорентьеву (Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва) за предоставление динуклеозидфосфатов и И. В. Смирнову (Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва) за предоставленную возможность использования программы для ЭВМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Richards F. M., Wyckoff H. W. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 647-806.
2. Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sakharovsky V. G., Yakovlev G. I. Europ. J. Biochem., 1978, v. 87, № 1, p. 45-54.
3. Uchida T., Egami F. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 265-270.
4. Arata Y., Kimura S., Matsuo H., Narita K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 73, № 1, p. 133-140.
5. Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya., Bezborodova S. I., Beletskaya O. P., Sakharovsky V. G. Europ. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 75-85.
6. Inagaki F., Kawano Y., Shimada I., Takahashi K., Miyazawa T. J. Biochem. (Tokyo), 1981, v. 89, № 4, p. 1185-1195.
7. Карнейский М. Я., Яковлев Г. И., Ботт В., Ежов В. А., Приходько А. Г. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1335-1347.
8. Карнейский М. Я., Яковлев Г. И., Сахаровский В. Г. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 5, с. 686-694.
9. Карнейский М. Я., Ханданян А. Ж., Чепурнова Н. К., Платонов А. Л., Яковлев Г. И. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1669-1679.
10. Карнейский М. Я. Молекулярная биология, 1976, т. 10, вып. 6, с. 1197-1210.
11. Kaiser P. M., Vonacker L., Witzel H., Holy A. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1975, B. 356, № 3, S. 143-155.
12. Yasuda T., Inoue Y. Europ. J. Biochem., 1981, v. 114, № 1, p. 229-234.
13. Imazawa M., Irie M., Ukita T. J. Biochem. (Tokyo), 1968, v. 64, № 5, p. 595-602.
14. Irie M. J. Biochem. (Tokyo), 1969, v. 65, № 1, p. 133-140.
15. Harada M., Irie M. J. Biochem. (Tokyo), 1973, v. 73, № 4, p. 705-716.
16. Igarashi K., Watanabe Y., Kumagai H., Ishisaki N., Hirose S. J. Biochem. (Tokyo), 1977, v. 81, № 3, p. 579-585.
17. Ежов В. А., Лузина И. Е. Микробиология, 1978, т. 47, вып. 5, с. 906-910.
18. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Крупянко В. И. Докл. АН СССР. Сер. биол., 1971, т. 196, № 4-6, с. 1460-1462.
19. Ильина Т. В., Безбородова С. И. Прикл. биохимия и микробиол., 1972, т. 8, № 2, с. 226-231.
20. Безбородова С. И. В кн.: Нуклеазы микроорганизмов. М.: Наука, 1974, с. 188-259.
21. Женодарова С. М., Хабарова М. И. Биохимия, 1972, т. 37, № 4, с. 869-873.
22. Peller L., Albery R. A. J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 22, p. 5907-5914.
23. Albery R. A., Bloomfield V. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 8, p. 2804-2810.

24. Сенченко В. Н., Яковлев Г. И., Колбановская Е. Ю., Смирнов И. В., Карнейский М. Я. Влоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1348–1356.
25. Anderson D. G., Hammes G. G., Walz F. G. Biochemistry, 1968, v. 7, № 5. p. 1637–1645.
26. Cavalieri L. F. J. Amer. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 21, p. 5268–5270.
27. Cleland W. W. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 2, p. 1–66.
28. Fersht A. R., Requena Y. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 25, p. 7079–7087.
29. Renard M., Fersht A. R. Biochemistry, 1973, v. 12, № 23, p. 4713–4717.
30. Witzel H. In: Progress in Nuclear Acid Research / Eds Davidson J. N., Cohn W. E. N. Y. – London: 1963, v. 2, p. 221–258.
31. Witzel H., Barnard E. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, v. 7, № 4, p. 289–294.
32. Witzel H., Barnard E. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, v. 7, № 4, p. 295–299.
33. Osterman H. L., Walz F. G. Biochemistry, 1978, v. 17, № 20, p. 4124–4130.
34. Shugar D. In: Methods in Enzymology / Eds Grossman L., Moldave K. N. Y. – London: Acad. Press, 1967, v. 12, part A, p. 131–137.
35. Machuga E., Klapper M. H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 2, p. 526–541.

Поступила в редакцию
9.IV.1982

STUDIES ON MECHANISM OF ACTION OF NONSPECIFIC RIBONUCLEASE FROM *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* FUNGUS

MOISEEV G. P., BOCHAROV A. L., MAMAIEVA O. K., YAKOVLEV G. I.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The pH-dependences of k_{cat} and k_{cat}/K_m were studied for the reactions of phosphodiester bond transesterification or cyclophosphate hydrolysis catalyzed by nonspecific ribonuclease *Pen. brevicompactum*. UpA, CpA and ApC, or nucleoside cyclophosphates U>p and C>p were used as substrated. The enzyme apparently operates by a general acid-base catalysis, two ionogenic protein groups of pK 3.4 and 5.6 being implicated. These pK values are 4.1 and 6.9 respectively in the RNase complexes with cyclophosphates. For dinucleoside phosphates, the rate constant is determined by two limiting steps, one of them being the enzyme – product dissociation. A conclusion is arrived that localization of the substrate phosphodiester bond in the RNase active site at the stage of enzyme-substrate complex formation is independent of the nature of constituting nucleoside heterocyclic bases.