



УДК 577.152.361\*1.042

**ИОНЫ ЦИНКА КАК АКТИВАТОРЫ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ  
ПИРОФОСФАТАЗЫ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ В РЕАКЦИЯХ  
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И СИНТЕЗА ПИРОФОСФАТА***Венер А. В., Мельник М. С., 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. П. Белозерского*

Исследованы реакции взаимодействия ортофосфата с неорганической пирофосфатазой из дрожжей в присутствии ионов цинка. Показано, что катионы  $Zn^{2+}$  активируют синтез пирофосфата из ортофосфата, причем выделяемый гель-фильтрацией комплекс  $E \cdot PP_i$  содержит до 0,75 моль пирофосфата на каждый активный центр; в присутствии ионов  $Zn^{2+}$  происходит фосфорилирование ортофосфатом одной из двух субъединиц фермента. Установлено, что для фосфорилирования пирофосфатазы необходимо заполнение катионами  $Zn^{2+}$  одного центра связывания на ферменте, а для синтеза пирофосфата — двух. Показано, что относительно большая устойчивость фосфорилированного фермента и комплекса фермента с пирофосфатом объясняется снятием с белка при гель-фильтрации катионов-активаторов.

Изучению ферментов фосфорного обмена, в частности ферментов, катализирующих гидролиз и синтез макроэргической фосфоангидридной связи, уделяется большое внимание, так как эти биокатализаторы необходимы для протекания многих важнейших процессов в живых организмах. Пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) являются представителями такого типа ферментов. Основная функция неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей — катализ гидролиза фосфоангидридной связи. Молекула белка состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой 32 000 [1], каждая из которых имеет каталитический центр [2—4]. Это металлозависимый фермент, проявляющий свою активность только в присутствии катионов некоторых двухвалентных металлов, наиболее эффективны из них ионы  $Mg^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ . Известен ряд фактов, указывающих на то, что эти катионы-активаторы оказывают на фермент неодинаковое влияние. Так, субстратная специфичность неорганической пирофосфатазы в присутствии  $Mg^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  различна. Если в присутствии  $Mg^{2+}$  ферментом гидролизуются только пирофосфат и в очень малой степени триполифосфат, то в присутствии  $Zn^{2+}$  наряду с этими субстратами гидролизуются еще и органические эфиры пиро- и триполифосфорных кислот. Это связано, по-видимому, с тем, что присоединение различных катионов-активаторов к ферменту вызывает разные конформационные изменения его молекулы. Существование таких конформационных перестроек может быть зарегистрировано с помощью УФ-спектроскопии [5]. Различие конформаций проявляется и при тепловой инаktivации фермента: добавление ионов магния стабилизирует фермент, а присутствие ионов цинка делает молекулу белка более лабильной [6].

В последние годы было обнаружено, что инкубация неорганической пирофосфатазы с ортофосфатом в присутствии  $Mg^{2+}$  приводит к синтезу пирофосфата, который прочно удерживается в активном центре, а также к фосфорилированию белка с образованием в его так называемом некаталитическом центре ацилфосфатной связи с остатком аспарагиновой кислоты [7, 8]. Обе реакции протекают без какого-либо эндогенного источника энергии и представляют несомненный интерес. Дальнейшее понимание происходящих процессов делало необходимым изучение реакции фермента с фосфатом в присутствии не только  $Mg^{2+}$ , но и  $Zn^{2+}$ .

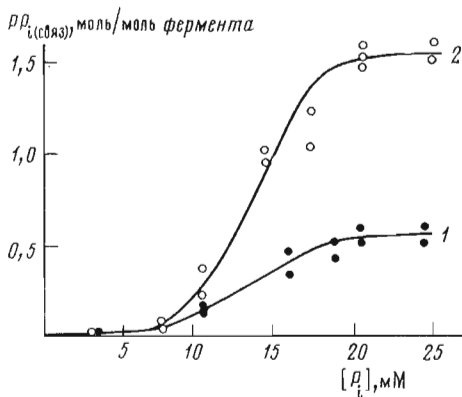


Рис. 1

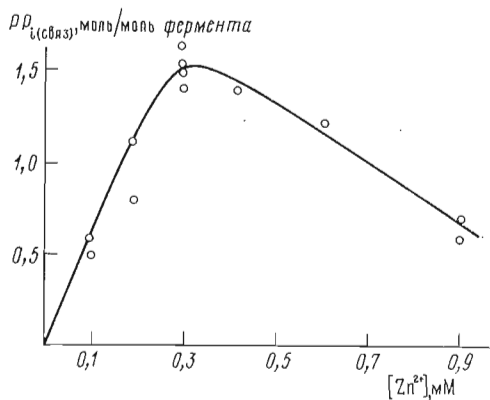


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость количества синтезированного на неорганической пирофосфатазе пирофосфата ( $PP_{i(\text{связ})}$ ) в присутствии 0,1 (1) и 0,3 мМ (2)  $Zn^{2+}$  от концентрации ортофосфата

Рис. 2. Зависимость количества синтезированного на неорганической пирофосфатазе пирофосфата от концентрации  $Zn^{2+}$  в инкубационной смеси;  $[P_i]$  20 мМ

Рис. 3. Распад комплекса фермента с пирофосфатом в отсутствие добавок (1) и в присутствии 20 мМ KCl (2), 0,3 мМ  $ZnCl_2$  (3), 1 мМ  $MgCl_2$  (4)

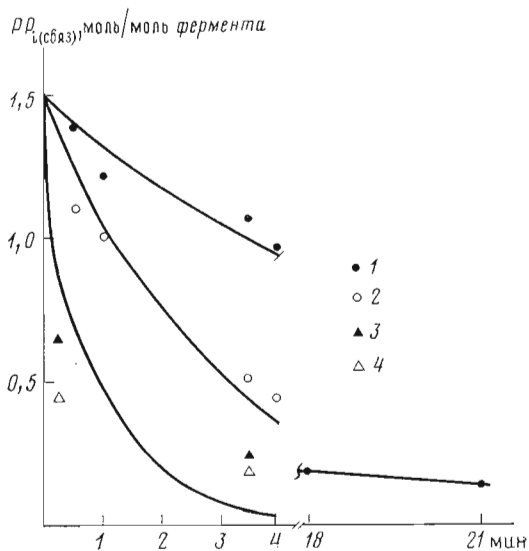


Рис. 3

Фермент инкубировали с  $Zn^{2+}$  и меченым  $^{32}P$  фосфатом, избыток низкомолекулярных веществ отделяли от белка методом быстрой гель-фильтрации с центрифугированием [9]. Связанные с белком фосфат и пирофосфат снимали хлорной кислотой, отделяли фосфат от пирофосфата экстракцией в виде фосфомолибденового комплекса [7] и по радиоактивности фракций определяли включение пирофосфата и фосфата в фермент. Хотя синтез пирофосфата на ферменте происходит одновременно с фосфорилированием некаталитического центра, для большей ясности эти процессы будут рассмотрены отдельно.

*Синтез пирофосфата из ортофосфата в активных центрах фермента в присутствии  $Zn^{2+}$ .* Было установлено, что синтез пирофосфата на ферменте идет в присутствии катионов  $Zn^{2+}$ . Чтобы найти оптимальные условия синтеза, концентрацию фосфата варьировали от 3 до 24 мМ (рис. 1). Реакционные смеси не содержали ионов щелочных металлов, так как их присутствие резко снижает выход связанного с ферментом пирофосфата. Из рис. 1 видно, что синтез пирофосфата на ферменте начинается при концентрации ортофосфата в среде  $\sim 6$  мМ и при обеих изученных концентрациях  $Zn^{2+}$  количество синтезированного пирофосфата достигает максимума в присутствии 20 мМ ортофосфата. Таким образом, для синтеза пирофосфата с участием  $Zn^{2+}$  нужны более высокие концентрации фосфата, нежели в присутствии  $Mg^{2+}$  (для  $Mg^{2+}$  — 10 мМ [7]).

В другой серии опытов варьировали концентрацию ионов цинка от 0,1 до 0,9 мМ при оптимальной концентрации фосфата (20 мМ). Известно, что на каждой субъединице пирофосфатазы дрожжей имеются три центра связывания ионов  $Zn^{2+}$ , причем первые два центра с константами диссоциации  $\sim 25$  и 300 мкМ необходимы для катализа гидролиза субстратов [10]. Третий центр заполняется при концентрациях  $Zn^{2+} > 300$  мкМ, и его насыщение приводит к ингибированию пирофосфатазы [11]. Следует отметить, что ионы магния такого ингибирующего влияния не оказывают. Из полученных нами результатов (рис. 2) можно сделать вывод, что для достижения максимального выхода синтезированного на ферменте пирофосфата необходимо связывание  $Zn^{2+}$  двумя центрами белка. По мере заполнения ионами цинка двух центров связывания ( $[Zn^{2+}] < 0,3$  мМ) количество связанного с ферментом пирофосфата возрастает. Снижение количества синтезированного пирофосфата при концентрациях  $Zn^{2+} > 0,3$  мМ, возможно, является следствием заполнения третьего центра связывания  $Zn^{2+}$  на ферменте. Влияние третьего центра, вероятно, объясняет и тот факт, что максимальное связывание пирофосфата составляет в присутствии  $Zn^{2+}$  1,5 моль на 1 моль фермента, а не 2 моль, как это происходит при активации фермента  $Mg^{2+}$  [7]. Таким образом, при активации пирофосфатазы катионами цинка в отличие от синтеза пирофосфата в присутствии  $Mg^{2+}$  существует явный оптимум концентрации  $Zn^{2+}$  (0,3 мМ), при котором активация максимальна.

Далее была изучена устойчивость получаемого комплекса фермента с пирофосфатом и влияние на нее некоторых катионов. Из рис. 3 и табл. 1 видно, что этот комплекс весьма лабилен — период его полураспада составляет 6 мин, а добавление катионов-активаторов ( $Mg^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ ) и катионов калия ускоряет этот процесс. Обнаруженное ускорение распада комплекса фермента с пирофосфатом под действием ионов калия может являться одной из причин того, что образование пирофосфата в присутствии катионов щелочных металлов снижается до нескольких процентов [12].

Факт выделения фермента, содержащего пирофосфат, нетривиален, так как гидролиз пирофосфата неорганической пирофосфатазой протекает очень быстро ( $k_{кат} 40\,000$  мин<sup>-1</sup>). Можно было предположить, что получаемый комплекс фермента с пирофосфатом не содержит катионов-активаторов, которые удаляются в процессе гель-фильтрации, в результате чего гидролиз пирофосфата становится невозможным. Косвенным подтверждением такого предположения служит ускорение распада выделенного комплекса при добавлении к нему  $Mg^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ . В связи с этим казалось целесообразным определить, содержатся ли катионы металла в выделенном комплексе. Такое исследование было проведено в системе, содержащей ионы кальция. Известно, что катионы  $Ca^{2+}$ , хотя и являются ингибиторами гидролиза пирофосфата неорганической пирофосфатазой из дрожжей, активируют синтез пирофосфата из ортофосфата на этом ферменте [7]. В настоящей работе было показано, что при содержании в среде 1 мМ  $Ca^{2+}$  и 10 мМ фосфата 1 моль фермента синтезирует около 2 моль пирофосфата. В опытах с  $^{45}Ca^{2+}$  было обнаружено, что выделяемый гель-фильтрацией комплекс фермента с пирофосфатом не содержит радиоактивного кальция; следовательно, катион-активатор действительно снимается с белка в процессе гель-фильтрации и не входит в состав выделяемого комплекса.

*Фосфорилирование неорганической пирофосфатазы в присутствии  $Zn^{2+}$ .* Было установлено, что фосфорилирование пирофосфатазы по некаталитическому центру происходит в присутствии не только  $Mg^{2+}$ , но и  $Zn^{2+}$ . Согласно рис. 4а, максимальное включение фосфата в фермент достигается в интервале концентрации фосфата 1—1,6 мМ и составляет 1 моль фосфата на 1 моль белка, т. е. в присутствии  $Zn^{2+}$ , как и в присутствии  $Mg^{2+}$ , происходит фосфорилирование только одной субъединицы фермента. Однако при изучении фосфорилирования иммобилизованной на сефарозе индивидуальной субъединицы пирофосфатазы был доказан факт существования центра фосфорилирования на каждой субъединице белка. Послед-

Устойчивость комплекса фермента с пирофосфатом в присутствии различных катионов  
рН 6,5; 18° С

Катион	Концентрация катиона, мМ	Период полураспада Е-РР <sub>i</sub> , мин	Катион	Концентрация катиона, мМ	Период полураспада Е-РР <sub>i</sub> , мин
—	—	6	Zn <sup>2+</sup>	0,3	1
Mg <sup>2+</sup>	1,0	1	K <sup>+</sup>	20	2

Таблица 2

Влияние катионов и фосфата на устойчивость фосфорилированного фермента  
рН 6,5; 18° С

Катион	Концентрация катиона, мМ	Концентрация фосфата, мМ	Период полураспада Е-Р, мин	Катион	Концентрация катиона, мМ	Концентрация фосфата, мМ	Период полураспада Е-Р, мин
—	—	—	420	K <sup>+</sup>	200	—	200
Mg <sup>2+</sup>	0,01	—	124	Mg <sup>2+</sup>	0,10	1	8
Mg <sup>2+</sup>	1,00	—	46	Mg <sup>2+</sup>	1,00	1	3
Zn <sup>2+</sup>	0,30	—	92	Zn <sup>2+</sup>	0,30	1	8
K <sup>+</sup>	20	—	200				

нюю инкубировали в присутствии Zn<sup>2+</sup> и 2 мМ <sup>32</sup>P-меченого фосфата, а затем промывали буфером до исчезновения радиоактивности в промывных водах. Результат экспериментов показал, что иммобилизованная субъединица фермента связывает ~1 моль фосфата на 1 моль. Таким образом, в нативном ферменте имеет место взаимное влияние субъединиц, приводящее, как и при активации фермента Mg<sup>2+</sup>, к фосфорилированию только одной из них.

Была изучена устойчивость фосфорилированного в присутствии Zn<sup>2+</sup> фермента и влияние на нее различных катионов и фосфата. Как вытекает из табл. 2, фосфорилированный фермент весьма устойчив — период его полураспада составляет ~7 ч. Катионы-активаторы значительно ускоряют процесс дефосфорилирования, а особенно быстрый сброс метки с белка наблюдается в присутствии этих катионов при обмене с немеченым фосфатом. В выделенном фосфорилированном белке было измерено содержание цинка; оказалось, что ионов металла он не содержит.

Надо отметить, что в присутствии 0,1 мМ Zn<sup>2+</sup>, когда полностью заполнен только один центр фермента, связывающий этот катион-активатор, а другой едва начинает заполняться, фосфорилирование фермента достигает максимума. Следовательно, в отличие от процесса синтеза пирофосфата для фосфорилирования достаточно заполнения только одного центра фермента катионами цинка. Интересным представляется анализ кривых фосфорилирования неорганической пирофосфатазы, полученных при двух различных концентрациях Zn<sup>2+</sup>. Из рис. 4 видно, что характер кривых различен: в присутствии 0,1 мМ Zn<sup>2+</sup> кривая фосфорилирования близка к гиперболической, а при концентрации 0,3 мМ приобретает S-образный характер и очень сходна с кривой фосфорилирования, полученной для 1 мМ Mg<sup>2+</sup> [7]. На рис. 4б данные рис. 4а представлены в координатах Хилла. При обеих концентрациях Zn<sup>2+</sup> фосфорилирование фермента протекает в две стадии: вначале фосфорилирование некооперативно (коэффициент Хилла близок к единице), а затем связывание фосфата становится кооперативным. Действительно, при меньшей концентрации Zn<sup>2+</sup> коэффициент Хилла для второй стадии фосфорилирования составляет примерно 2,6, а при большей — ~6. Таким образом, в первом случае при фосфорилировании, вероятно, проявляется взаимное влияние двух каталитических центров связывания фосфата, а во втором — еще и двух активных центров, каждый из которых может связать две молекулы фосфата.

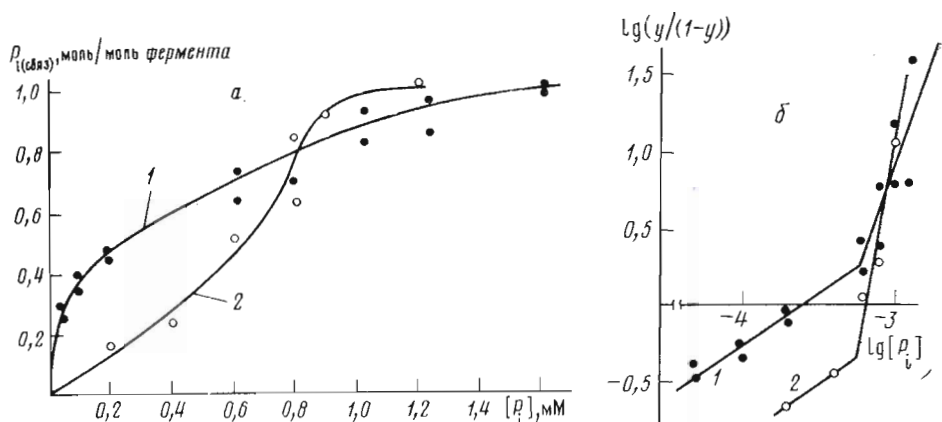


Рис. 4. Зависимость фосфорилирования фермента в присутствии 0,1 (1) и 0,3 мМ (2)  $ZnCl_2$  от концентрации ортофосфата (а); б — та же зависимость, представленная в координатах Хилла.  $y = P_{i(связ)}/E$  — степень насыщения белка фосфатом

Итак, можно заключить, что заполнения одного центра связывания ионов цинка на ферменте достаточно для фосфорилирования, но недостаточно для синтеза пиррофосфата в активном центре пиррофосфатазы. Насыщение же цинком двух центров связывания приводит к созданию такой активной формы фермента, в которой сильно выражено взаимное влияние всех центров связывания и которая способна к синтезу пиррофосфата.

### Экспериментальная часть

Неорганическую пиррофосфатазу получали из пекарских дрожжей по методике Э. А. Браги и др. [13]. В работе использовали:  $^{32}P$ -меченую фосфорную кислоту без носителя (Amersham, Англия) или марки ос.ч. отечественного производства с активностью 1—30 мКи/мл;  $^{45}Ca$ -меченый хлорид кальция без носителя (Amersham) с активностью 0,5—1 мКи/мл; гидроокись тетраметиламмония (Sigma, США). Остальные реагенты были марки ос.ч. и х.ч. Тетраметиламмонийфосфат получали нейтрализацией фосфорной кислоты гидроокисью тетраметиламмония. Для измерения радиоактивности использовали сцинтилляционный счетчик ЛКВ (Швеция).

*Получение фосфорилированного и пиррофосфорилированного фермента.* Реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 10 мкг фермента, 0,1—0,9 мМ  $ZnCl_2$  и 0,1—24,0 мМ  $^{32}P$ -меченый тетраметиламмонийфосфат с удельной радиоактивностью  $\sim 20\,000$  (имп/мин)/нмоль в 0,1 М буфере НЕРЕС — тетраметиламмонийгидрат, рН 6,5. В опытах, где вместо  $ZnCl_2$  использовали  $CaCl_2$ , концентрация последнего составляла 1 мМ, при использовании  $^{45}CaCl_2$  его удельная радиоактивность составляла  $\sim 10\,000$  (имп/мин)/нмоль. Реакционную смесь выдерживали 5—10 мин при 18°, модифицированный белок отделяли от избытка реагентов методом гель-фильтрации с центрифугированием [9]. Количество фермента в элюате определяли по его активности [13], а содержание фосфата или кальция — по радиоактивности. Фосфат и пиррофосфат снимали с фермента добавлением 0,3—0,4 М хлорной кислоты и отделяли ортофосфат от пиррофосфата экстракцией его фосфомолибденового комплекса смесью изобутанол — бензол [7].

*Фосфорилирование иммобилизованной субъединицы неорганической пиррофосфатазы дрожжей.* Иммобилизацию индивидуальных субъединиц фермента проводили по методике [14]. Сефарозу, содержащую иммобилизованную субъединицу, суспендировали в равном объеме 0,1 М буфера НЕРЕС — тетраметиламмонийгидрат, рН 6,5, содержащего  $2 \cdot 10^{-4}$  М  $ZnCl_2$ . К 1 мл суспензии добавляли радиоактивный раствор тетраметиламмонийфосфата до концентрации 1—2 мМ. Через несколько минут сефарозу помещали на фильтр, промывали буфером до исчезновения радиоактивно-

сти в промывных водах и определяли радиоактивность сефарозы. Для контроля те же операции проводили с сефарозой, не содержащей иммобилизованного фермента.

*Изучение устойчивости фосфорилированного фермента и комплекса фермента с пирофосфатом.* Выделенный, как описано выше, фосфорилированный фермент или комплекс фермента с пирофосфатом инкубировали в 0,1 М буфере HEPES — тетраметиламмонийгидрат, pH 6,5, при 18°С с добавлением указанных в табл. 1 и 2 реагентов, через определенные промежутки времени из смеси отбирали аликваты и проводили их гель-фильтрацию по методу [9]. В элюате определяли количество фосфата или пирофосфата, связанного с белком (см. выше).

*Определение количества цинка в фосфорилированном белке.* Выделенный, как описано выше, фосфорилированный фермент, упаривали досуха, минерализовали в смеси концентрированной хлорной и 10 н. серной кислот и определяли содержание катионов цинка по образованию хелатного комплекса с дитизоном [15].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrikson R. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 3, p. 714—725.
2. Kunitz M. J. Gen. Physiol., 1952, v. 35, № 3, p. 423—449.
3. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Awaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 1, p. 184—194.
4. Ridlington J. W., Butler L. G. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 22, p. 7303—7307.
5. Braga E. A., Awaeva S. M. FEBS Lett., 1972, v. 27, № 2, p. 251—255.
6. Шафранский Ю. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 6, с. 1248—1254.
7. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Awaeva S. M. FEBS Lett., 1981, v. 124, № 2, p. 245—247.
8. Бакулева Н. П., Костенко Е. Б., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 332—340.
9. Penefsky P. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 9, p. 2891—2899.
10. Мельник М. С., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 47, № 2, с. 323—328.
11. Волк С. Е., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 1, с. 33—38.
12. Janson C. A., Degani C., Boyer P. D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 8, p. 3743—3749.
13. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 2, с. 344—350.
14. Плаксина Е. А., Сергеенко О. В., Склякина В. А., Аваева С. М. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 357—364.
15. Уиланд Ф., Янсен А., Туринг Д., Вюни Г. Комплексные соединения в аналитической химии. М.: Мир, 1975, с. 418—423.

Поступила в редакцию  
17.1.1983

#### ZINC IONS AS ACTIVATORS OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM BAKER'S YEAST IN PHOSPHORYLATION AND PYROPHOSPHATE SYNTHESIS

VENER A. V., MEL'NIK M. S., NAZAROVA T. I., AWAIEVA S. M.

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

Interaction of inorganic pyrophosphatase from baker's yeast with  $^{32}\text{P}$ -labeled orthophosphate in the presence of zinc ions was investigated by a gel filtration method. The activation of pyrophosphate synthesis from orthophosphate by  $\text{Zn}^{2+}$  was observed. The isolated complex of the protein with pyrophosphate contained up to 0,75 moles of pyrophosphate per active site. In the presence of  $\text{Zn}^{2+}$  phosphorylation of one of the two pyrophosphatase subunits by orthophosphate took place. Occupation of one site by  $\text{Zn}^{2+}$  is necessary for phosphorylation, while the pyrophosphate synthesis requires two metal-binding sites being filled in. It was demonstrated that a relatively high stability of the phosphorylated enzyme and the enzyme — pyrophosphate complex can be explained by removal of the activating cations from the protein by gel filtration.