



УДК 577.152.411*15'134

**ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЙ АРГИНИНОВЫЙ ОСТАТОК
КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ФОРМЫ
ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ ИЗ *E. COLI****Воспелъникова Н. Д., Дарий Е. Л., Сухарева В. С.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Глутаматдекарбоксилаза из *E. coli* инактивируется 2,3-бутандионом в кислой среде (рН 4,7). Инактивация сопровождается модификацией одного аргининового остатка на субъединицу фермента. Доказано, что в условиях опыта модификация аргининового остатка под действием 2,3-бутандиона строго избирательна. В ходе модификации уменьшается максимум спектра поглощения при 420 нм и появляется новый спектральный максимум в области 330–335 нм. Глутаровая, янтарная, а также валериановая кислоты, способные связываться в активном центре фермента, защищают его от инактивации. Выдвигается предположение, что остаток аргинина находится в субстратсвязывающем участке активного центра глутаматдекарбоксилазы и взаимодействует с дистальной карбоксильной группой субстрата.

Глутаматдекарбоксилаза из *E. coli* (КФ 4.1.1.15) может существовать в двух рН-зависимых обратимых конформационных состояниях [1]. Каталитически активная форма фермента (рН ≤ 5,3) характеризуется максимумом спектра поглощения при 420 нм; в этой форме NH_2 -группа лизинового остатка белка образует шиффово основание с альдегидной группой кофермента — пиридоксальфосфата [2]. При смещении величин рН до ≥ 6,0 фермент переходит в каталитически инертную форму с максимумом поглощения при 340 нм. Кофермент при этом присоединен к белку, образуя комплекс по типу замещенного альдамина [2].

Исследование роли аргининовых остатков в функции фермента было начато в работах Фонды и соавт. [3]; модификацию фермента проводили в обычных при использовании бутандиона условиях — при рН 7,5–8,0, когда декарбоксилаза находится в инертной форме. Однако для понимания роли функциональных групп в активном центре фермента необходимо, по-видимому, изучать декарбоксилазу в активной конформации, т. е. при рН < 5,3. В литературе есть сведения о модификации аргининовых остатков в белках бутандионом при слабокислых и нейтральных значениях рН. Такие исследования были проведены с NAD- и NADP-зависимыми изоцитратдегидрогеназами [4, 5]; при этом было доказано, что реакция протекает специфично и модифицируются лишь наиболее реакционноспособные аргининовые остатки. В связи с этим в настоящей работе было предпринято исследование возможности модификации бутандионом каталитически активной формы глутаматдекарбоксилазы в слабокислой среде.

Модификация глутаматдекарбоксилазы бутандионом, высоко специфичным реагентом на аргининовые остатки белков [6], приводит к существенному снижению ферментативной активности глутаматдекарбоксилазы, причем инактивация фермента идет параллельно значительному уменьшению поглощения при 420 нм (рис. 1). При концентрации бутандиона 30 мМ величина поглощения при 420 нм в течение 1 ч уменьшается на 80%. При использовании больших концентраций модификатора можно достигнуть полного исчезновения поглощения при 420 нм и практически полного падения ферментативной активности декарбоксилазы.

Процесс модификации декарбоксилазы подчиняется кинетике реакции первого порядка как по отношению к белковому субстрату (см. рис. 1), так и по отношению к бутандиону. Это указывает на то, что инактивация фермента — следствие модификации лишь одного остатка аргинина, т. е.

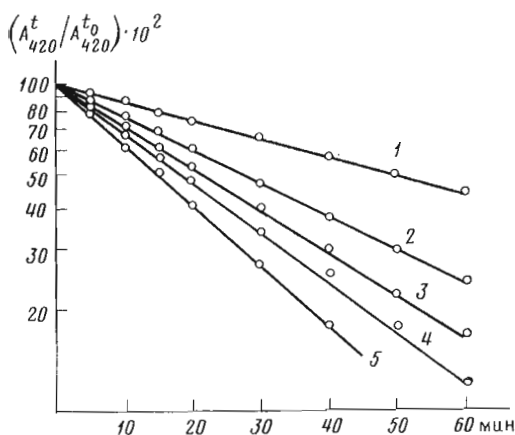


Рис. 1

Рис. 1. Модификация глутаматдекарбоксилазы под действием бутандиона. Концентрация бутандиона (мМ): 1 — 18,6; 2 — 30; 3 — 40; 4 — 50; 5 — 70. Концентрация фермента 16 мкМ. A^t и A^t_0 — поглощение нативной и модифицированной глутаматдекарбоксилазы

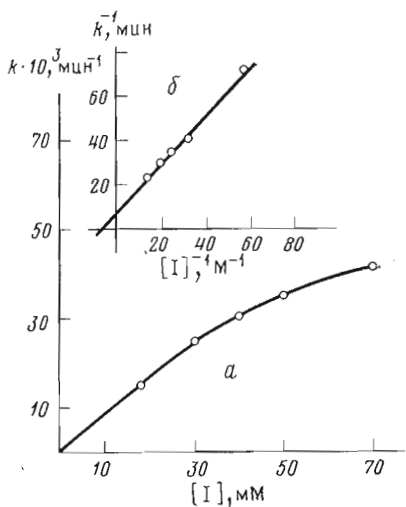


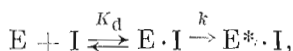
Рис. 2

Рис. 2. Зависимость эффективной константы скорости инактивации глутаматдекарбоксилазы от концентрации бутандиона в прямых (а) и обратных (б) координатах. Концентрация фермента 16 мкМ; белок растворен в 0,01 М ацетате натрия с 0,02 М NaCl и 1 мМ EDTA, pH 4,7

связана с включением единственной молекулы модифицирующего агента на субъединицу глутаматдекарбоксилазы.

Вместе с тем обработанная бутандионом декарбоксилаза может быть реактивирована. Так, освободив фермент от избытка модификатора и выдерживая его 24 ч в растворе 0,1 М фосфата натрия с 10^{-3} М EDTA и $4 \cdot 10^{-3}$ М дитиотреитом (pH 8,0), мы смогли на 50% восстановить ферментативную активность модифицированной декарбоксилазы.

Гиперболический характер зависимости эффективной константы скорости модификации декарбоксилазы от концентрации бутандиона (рис. 2а) указывает на двухстадийную природу реакции: инактивации декарбоксилазы предшествует образование обратимого фермент-ингибиторного комплекса. Таким образом, реакцию инактивации декарбоксилазы бутандионом можно изобразить следующей схемой [7]:



где E и E^* — соответственно нативная и модифицированная бутандионом (I) глутаматдекарбоксилазы, K_d — константа диссоциации комплекса фермент — бутандион, k — константа скорости превращения этого комплекса, т. е. константа скорости инактивации декарбоксилазы.

Линеаризация наблюдаемой зависимости эффективной константы скорости модификации декарбоксилазы от концентрации бутандиона (рис. 2б) в двойных обратных величинах позволяет определить значение K_d (0,14 М) и k (0,17 мин $^{-1}$).

Скорость реакции модификации глутаматдекарбоксилазы под действием бутандиона зависит от величины pH среды. Так, скорость реакции инактивации фермента бутандионом увеличивается при переходе от нейтральных к слабощелочным значениям pH и становится максимальной при pH 4,7–4,9 (рис. 3).

В связи с тем что модификацию глутаматдекарбоксилазы бутандионом мы проводили при pH 4,7–4,9, особое внимание было уделено проверке специфичности этой реакции.

С помощью метода Сакагучи установлено, что в модифицированном белке содержится в среднем на один аминокислотный остаток аргинина в расчете на субъединицу меньше по сравнению с немодифицированной декарбоксилазой. Это подтвердили и результаты аминокислотного анализа: 21,7 и 20,7 остатков аргинина в субъединице нативного и модифицированного белка соответственно. Другие аминокислотные остатки глутаматдекарбоксилазы, в том числе остатки цистеина и триптофана, модификации не подвергались. Таким образом, инактивация декарбоксилазы связана

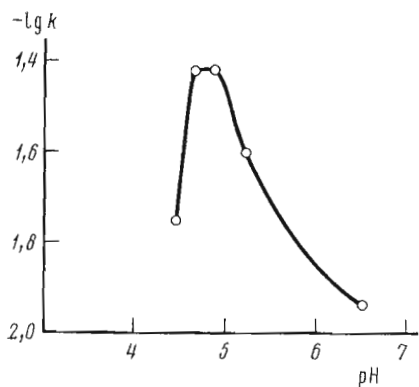


Рис. 3. Зависимость эффективной константы скорости инактивации глутаматдекарбоксилазы под действием бутадиона от pH. Концентрация фермента 16 мкМ, бутадиона 57 мМ

с модификацией только одного аргининового остатка в расчете на субъединицу фермента.

С целью выяснения функции этого важного для активности фермента аргининового остатка мы сравнили спектральные свойства модифицированного и немодифицированного фермента, а также влияние аналогов субстрата на вызываемую бутадионом инактивацию глутаматдекарбоксилазы (рис. 4 а, б). Сравнение спектров поглощения модифицированного бутадионом и нативного белков показало, что инактивация декарбоксилазы приводит к уменьшению характеристического максимума поглощения декарбоксилазы при 420 нм и увеличению поглощения в области 330–335 нм. В спектрах

КД также наблюдается уменьшение спектрального максимума при 420 нм и появляется новая оптически активная полоса в области 305–335 нм. Эти результаты указывают на то, что модифицируемый бутадионом аргининовый остаток, по всей видимости, входит в область активного центра глутаматдекарбоксилазы. Кроме того, в ходе инактивации декарбоксилазы бутадионом, вероятно, происходит изменение характера связи пиридоксальфосфата с белком. Именно об этом свидетельствует исчезновение в модифицированном ферменте спектрального максимума при 420 нм, характерного для связи пиридоксальфосфата с белком в виде протонированного шиффова основания, и появление максимума поглощения в области 330–335 нм. Последнее говорит о том, что в ходе инактивации фермента под действием бутадиона, по-видимому, возникает комплекс кофермента с белком по типу замещенного альдамина.

Известно, что многие алифатические моно- и дикарбоновые кислоты являются конкурентными по отношению к субстрату (глутаминовой кислоте) ингибиторами глутаматдекарбоксилазы [8–10].

Проведенное нами исследование показало, что аналоги субстрата, способные связываться в активном центре глутаматдекарбоксилазы, такие, как глутаровая, янтарная и валериановая кислоты, а также уксусная кислота, полностью защищают фермент от инактивации бутадионом (рис. 5). γ -Аминомасляная кислота и норвалин, не способные к связыванию в активном центре исследуемой декарбоксилазы, не влияют на скорость ее модификации бутадионом.

Наиболее вероятно, что модифицируемый бутадионом аргининовый остаток глутаматдекарбоксилазы участвует в связывании молекулы субстрата, глутаминовой кислоты, в активном центре фермента. Такое связывание, по-видимому, реализуется благодаря взаимодействию гуанидиновой группы остатка аргинина с дистальной карбоксильной группой субстрата. О важности такого взаимодействия при формировании каталитически активного фермент-субстратного комплекса свидетельствует то обстоятельство, что эффект защиты от инактивации обнаружен лишь для карбоновых кислот, способных связываться в субстратсвязывающем центре фермента (рис. 5, 3).

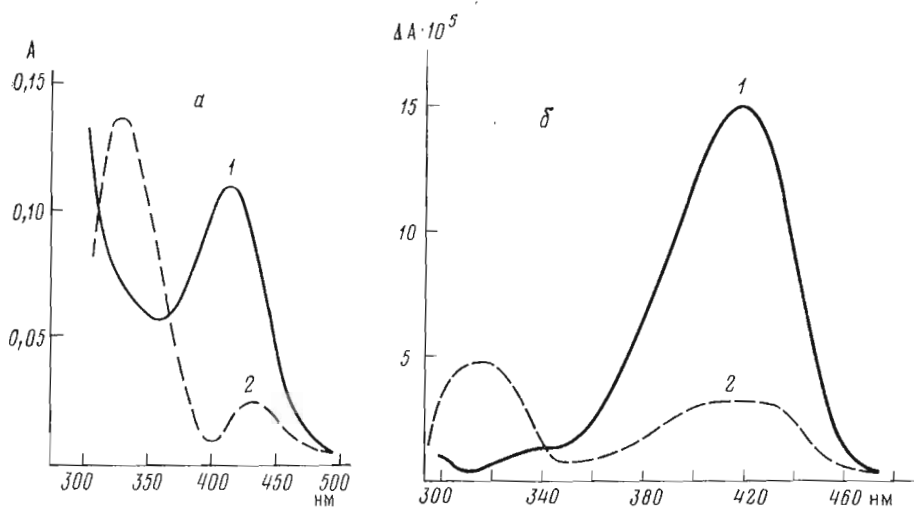


Рис. 4. Спектры поглощения (а) и КД-спектры (б) нативной (1) и модифицированной бутандионом (2) глутаматдекарбоксилаз. Концентрация фермента 0,8 (а) и 0,4 мг/мл (б); 0,01 М ацетат натрия с 0,01 М NaCl и 0,1 мМ EDTA, pH 4,7

Обнаруженный нами функционально важный аргининовый остаток декарбоксилазы становится избирательно реакционноспособным лишь при pH 5,0. По-видимому, в данном ферменте эта аминокислота имеет необычайно низкое значение pK 4,9–5,0 (рис. 3). Это может быть следствием того, что данный аргининовый остаток, принадлежащий субстратсвязывающей области активного центра бактериальной декарбоксилазы, находится в окружении гидрофобных остатков аминокислот. Нельзя исключить вероятность того, что гидрофобная среда, а возможно, и электростатическое влияние полярных аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, по-видимому, значительно снижают pK функционально важного остатка аргинина глутаматдекарбоксилазы. В настоящее время в литературе накопились данные о значительно измененных значениях pK ряда аминокислотных остатков, выполняющих важные функции в белках. Например, для ацетоацетатдекарбоксилазы показано, что функционально важный остаток лизина имеет очень низкое значение pK — 5,9 [11]. Завышенное значение pK 6,8–7,0 имеет карбоксильная группа митохондриальной АТФ-азы [12].

Блокирование остатка аргинина глутаматдекарбоксилазы бутандионом приводит, по-видимому, к определенным изменениям в активном центре фермента, следствием которых является изменение характера связи кофермента с белком. Аналогичные изменения в ходе модификации ферментов аргининспецифичными реагентами показаны и для ряда других белков [13, 14].

Ранее в работе Фонды и соавт. [3] для модификации глутаматдекарбоксилазы использовался целый ряд аргининспецифичных реагентов, среди которых был и бутандион. При этом реакцию проводили при pH 7,5–8,0. В этих условиях использованные ингибиторы не влияли на активность холофермента. Мы предполагаем, что причиной этого является то, что авторы исследовали фермент в его каталитически иерстной конформации, а именно при pH 7,5–8,0. Результаты этого исследования показали также, что модификация одного аргининового остатка в расчете на субъединицу белка приводит к потере способности апофермента реактивироваться пиридоксальфосфатом. Было сделано предположение о том, что данный аргининовый остаток участвует в формировании коферментсвязывающей области активного центра бактериальной глутаматдекарбоксилазы.

Совокупность данных Фонды и др., а также результатов, представленных в настоящей работе, позволяют сделать предположение о том, что, по-видимому, в активный центр глутаматдекарбоксилазы входят два ос-

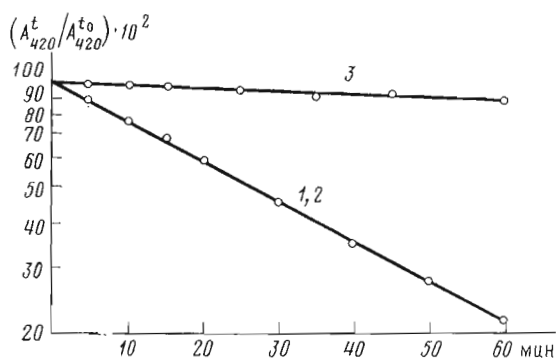


Рис. 5. Влияние аналогов субстрата на вызываемую бутандионом инактивацию глутаматдекарбоксилазы. Фермент (16 мкМ) инкубировали с 30 мМ бутандионом в отсутствие добавок (1) и в присутствии 1 мМ γ -аминомасляной кислоты или 10 мМ *L*-норвалина (2), 0,01 М глутаровой, 0,1 М янтарной, 9 мМ валериановой или 0,2 М уксусной кислот (3). Кислоты предварительно нейтрализованы

татка аргинина. Вероятно, один из них участвует в связывании субстрата, а другой необходим для формирования коферментсвязывающей области активного центра декарбоксилазы. В пользу этого предположения говорит различное значение pK этих функционально важных аминокислотных остатков аргинина.

Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы: свеженерегнаный бутандион, реактив Элмана, дитиотреит (Sigma, США); додецилсульфат натрия, пиридоксальфосфат (Serva, ФРГ); γ -аминомасляная кислота (Calbiochem, США), норвалин (Reanal, Венгрия). Глутаровая и янтарная кислоты — перекристаллизованные препараты категории х.ч.; валериановая кислота — перегнанная, категории ч. Остальные реактивы, использованные в работе, были отечественного производства категории ос.ч. или х.ч.

Глутаматдекарбоксилазу из штамма *E. coli* 600 получали по методу, описанному ранее [15]. Ферментативную активность определяли по методу Шукуя и Шверта [16]. В работе использовали препараты 90% чистоты с удельной активностью 30 000 мкл $CO_2/10$ мин/мг белка. Содержание белка в пробах определяли спектрофотометрически на основе величины поглощения $E_{280}^{1\%} = 17$ [17].

Подготовка белка для модификации бутандионом. Для работы препараты фермента предварительно подвергали обработке с целью защиты SH-групп от окисления: перекристаллизованный препарат глутаматдекарбоксилазы выдерживали 40 мин при 20° С в растворе 0,1 М фосфата натрия с 1 мМ EDTA и 4 мМ дитиотреитом, pH 8,0 (раствор 1). Далее путем гель-фильтрации через сефадекс G-50 фермент переводили в 0,01 М раствор ацетата натрия, содержащий 10 мМ NaCl и 1 мМ EDTA, pH 4,7–4,8 (раствор 2), и использовали для опытов.

Модификация глутаматдекарбоксилазы бутандионом. Инкубацию фермента с бутандионом проводили при 20° С в пробах, содержащих 1 мл раствора белка (16 мкМ в расчете на субъединицу фермента) и от 0,008 до 0,06 мл 1,2 М раствора бутандиона в воде. В отдельных экспериментах пробы содержали также γ -аминомасляную кислоту, норвалин или нейтрализованную глутаровую, янтарную, валериановую или уксусную кислоту (см. рис. 5). После добавления бутандиона в растворе проверяли величину pH, которую поддерживали на уровне 4,7–4,8. О ходе реакции модификации судили либо по падению ферментативной активности, либо по уменьшению поглощения белка при 420 нм во времени. Для измерения активности фермента через определенные интервалы времени из раствора белка с бутандионом отбирали аликвоты по 10 мкл. Их немедленно вносили в боковые отростки сосудиков Варбурга, которые содержали 200 мкл 1 мМ раствора EDTA с 0,5 мМ пиридоксальфосфатом.

По окончании реакции избыток бутандиона удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным раствором 2. В полученных образцах инактивированного фермента снимали спектры поглощения и определяли содержание аргинина и триптофана.

Реактивация модифицированного бутандионом фермента. Глутаматдекарбоксилазу (1 мл, [E] 16 мкМ), инактивированную до остаточной ак-

тивности 25%, переводили на сефадексе G-50 в раствор 1. Оставляли пробу на 24 ч при 20° С, затем измеряли активность фермента. Последнюю сравнивали с активностью в контрольной пробе немодифицированного белка, которую обрабатывали так же.

Определение числа остатков аргинина, триптофана и цистеина. Количественное определение аргининовых остатков проводили по методу Сакагучи [18], а также путем аминокислотного анализа после гидролиза проб белка в 6 н. HCl в течение 24 ч при 110° С.

Общее содержание триптофана определяли спектрофотометрическим методом Эделхоха [19].

Титрование SH-групп проводили по методу Элмана [20]. Общее число SH-групп в нативном и модифицированном белке определяли в присутствии 0,2% додецилсульфата натрия.

Спектры поглощения фермента измеряли на регистрирующем спектрофотометре Beckman-25 в микрокуветах с длиной пути 1 см. Спектры КД снимали на дихрографе Roussel-Jouan III (Jobin-Ivon, Франция) в кювете с длиной оптического пути 2 см при чувствительности $2 \cdot 10^{-5}$.

Авторы приносят благодарность А. Е. Браунштейну за ценные советы при выполнении и оформлении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shukuya R., Schwert G. W. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 6, p. 1653–1657.
2. Anderson J. A., Chang H.-F. W. Arch. Biochem. and Biophys., 1965, v. 110, № 2, p. 346–349.
3. Cheung S.-T., Fonda M. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 198, № 2, p. 541–547.
4. Hayman S., Colman R. F. Biochemistry, 1978, v. 17, № 20, p. 4161–4168.
5. Ehrlich R. S., Colman R. F. Biochemistry, 1977, v. 16, № 15, p. 3378–3383.
6. Riordan J. F. Mol. Cell. Biochem., 1979, v. 26, № 2, p. 71–92.
7. Kitz R., Wilson J. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 10, p. 3245–3249.
8. Fonda M. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1972, v. 153, № 2, p. 763–768.
9. Fonda M. L. Biochemistry, 1972, v. 11, № 7, p. 1304–1309.
10. Сухарева Б. С., Маликова Л. Г. Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 2, с. 394–400.
11. Schmidt D. E., Westheimer F. M. Biochemistry, 1971, v. 10, № 7, p. 1249–1253.
12. Имедидзе Э. А., Козлов И. А., Метельская В. А., Мильграм Я. М. Биохимия, 1978, т. 43, № 8, с. 1405–1413.
13. Kazarinoff M. N., Snell E. E. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 21, p. 7598–7602.
14. Nagradova N. K., Asryants R. A., Benkevich N. V. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 527, № 2, p. 319–326.
15. Сухарева Б. С., Браунштейн А. Е. Молекулярн. биология, 1971, т. 5, № 2, с. 302–317.
16. Shukuya R., Schwert G. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 6, p. 1649–1652.
17. Strausbauch P. H., Fischer E. H. Biochemistry, 1970, v. 9, № 2, p. 233–238.
18. Tomlinson G., Viswanath T. Anal. Biochem., 1974, v. 60, № 1, p. 15–24.
19. Edelhoch H. Biochemistry, 1967, v. 6, № 7, p. 1948–1954.
20. Ellman G. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70–77.

Поступила в редакцию
31.I.1983

AN ESSENTIAL ARGININE RESIDUE IN THE CATALYTICALLY ACTIVE FORM OF *E. COLI* GLUTAMATE DECARBOXYLASE

VOSEPLNIKOVA N. D., DARIJ E. L., SUKHAREVA B. S.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Science
of the USSR, Moscow*

Glutamate decarboxylase from *E. coli* is inactivated by 2,3-butanedione in acid medium (pH 4.7). Inactivation is associated with modification of one arginine residue per subunit; the modification is strictly selective. In the course of modification maximum at 420 nm in the absorption and CD spectra is greatly diminished, and there appears a spectral maximum at 330–335 nm and a broad CD extremum in the 305–335 nm region. Binding of glutaric, succinic or valeric acid in the active centre of the enzyme protected it from inactivation. It is plausible that an arginine residue is situated in the substrate-binding site of the enzyme active centre and interacts with the distal carboxylic group of a substrate.