

А. П. БАРХАШ и Н. С. ДЕМЯНОВСКАЯ

ГЛЮКОНОКИНАЗА ДРОЖЖЕЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 VI 1951)

В работе В. А. Энгельгардта и А. П. Бархаша (1) было показано, что глюконовая кислота может подвергаться фосфорилированию в дрожжевом мацерационном соке под влиянием аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Вскоре затем А. П. Бархашу и Н. С. Демяновской удалось воспроизвести эту реакцию в опытах с энзиматической системой, выделенной из дрожжей, и были изучены некоторые свойства фермента, катализирующего эту реакцию (2). Недавно Коген (3) сообщил об обнаружении им в культуре кишечной палочки, адаптированной к глюконовой кислоте, фермента глюконокиназы, не упоминая при этом вышеуказанных работ с дрожжевым ферментом (1,2).

В настоящем сообщении приводятся данные, подтверждающие наличие в дрожжах специфического фермента, отличного от гексокиназы, осуществляющего фосфорилирование глюконовой кислоты, и описываются некоторые свойства этого фермента.

Методика. Са-соли глюконовой кислоты, *d*- и *l*-арабиновых кислот были получены нами в лаборатории окислением бромной водой *d*- и *l*-арабинозы. Са-соль 2-кетоглюконовой кислоты была предоставлена нам проф. В. В. Первозванским. Желтый фермент был получен из дрожжевого мацерационного сока по прописи Варбурга (4), в виде сырого продукта. Кодегидраза II готовилась из бычьих эритроцитов по методу Варбурга (5), причем очистка доводилась до 2-й стадии включительно. Опыты проводились с лебедевским дрожжевым мацерационным соком, а также с ферментными препаратами, выделенными из дрожжей (см. ниже). Наблюдения за ходом газообмена велись в приборе Варбурга в двух параллельных сосудиках (с КОН и без КОН). Неорганический фосфор определялся в трихлоруксусном фильтрате по Фиске — Суббароу, «7-минутный» — после 7 мин. кипячения в 1 N HCl; отсюда вычитанием неорганического P из «7-минутного» находился легко гидролизуемый P

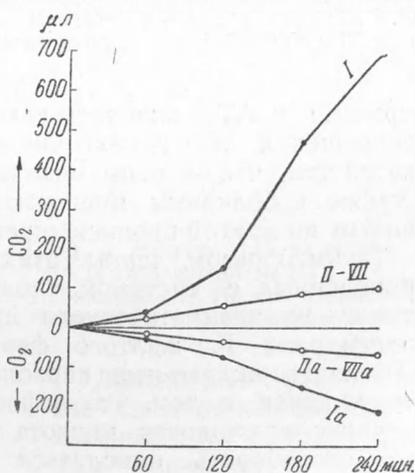


Рис. 1. Окислительный распад различных субстратов (по 30 мМ) в дрожжевом мацерационном соке (0,5 мл). Общий объем реакционной смеси 2 мл. Опыт в приборе Варбурга. 28°. I и Ia — глюконат; II и IIa — 2-кетоглюконат; III и IIIa — *d*-арабиноза; IV и IVa — *l*-арабиноза; V и Va — *d*-арабионовая кислота; VI и VIa — *l*-арабионовая кислота; VII и VIIa — без добавлений

($P_{л.г.} = P_{7\text{ мин.}} - P_{0\text{ мин.}}$). Прирост трудно гидролизуемого Р находился по разности между убылью легко гидролизуемого Р и приростом неорганического Р ($\Delta_{гр.г.Р} = \Delta_{л.г.Р} - \Delta_{неорг.Р}$). В опытах с гексокиназой легко гидролизуемый Р АТФ определялся непосредственно путем осаждения АТФ уксуснокислой ртутью по Н. Е. Сакову (6).

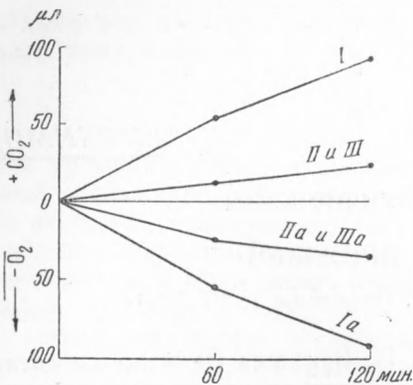


Рис. 2. Влияние АТФ (20 μM) на расщепление глюконата (20 μM) системой: ферментный препарат из дрожжей (15 мг) + кодегидраза II (0,2 мг) + желтый фермент (0,2 мл сырого продукта). Общий объем 3 мл. Опыт в приборе Варбурга. 28°. I и Ia — глюконат + АТФ; II и III — без АТФ; III и IIIa — без глюконата

Как видно из рис. 1, в пробе с добавленным глюконатом происходит потребление O_2 и выделение CO_2 , в то время как газообмен в пробах с другими испытанными субстратами практически полностью совпадает с газообменом в контроле (без добавленного субстрата).

Для получения пригодного для хранения энзиматического препарата, способного окислять глюконат в присутствии кодегидразы II, желтого фермента и АТФ, мы воспользовались прописью Диккенса (7) для получения одного из применявшихся им препаратов (препарата А). Оказалось, что в этом препарате, содержащем ферментную систему, окисляющую фосфоглюконат, содержится также фермент, способный в присутствии кодегидразы II, желтого

фермента и АТФ окислять глюконовую кислоту (рис. 2). Отсутствие превращений глюконовой кислоты, отмеченное Диккенсом (7), объясняется тем, что он испытывал глюконовую кислоту в отсутствие АТФ, а также с белковым препаратом, полученным по другой прописи (препарат В).

Таким образом, данные этих опытов, проведенных с системой, сконструированной из энзиматического препарата, кодегидразы II, желтого фермента и АТФ, подтверждают наше первоначальное утверждение о том, что нефосфорилированная глюконовая кислота приобретает способность окисляться лишь в условиях, обеспечивающих ее предшествующее фосфорилирование, а именно, в присутствии специфического белка и АТФ. Специально поставленные опыты показали, что АТФ в этой реакции нельзя заменить ни адениловой кислотой, ни аденозином.

В связи с представлением о наличии фермента, осуществляющего фосфорилирование глюконовой кислоты, основной интерес представляют результаты опытов по исследованию баланса фосфора при распаде глюконовой кислоты в диализованном соке с добавлением АТФ. Как

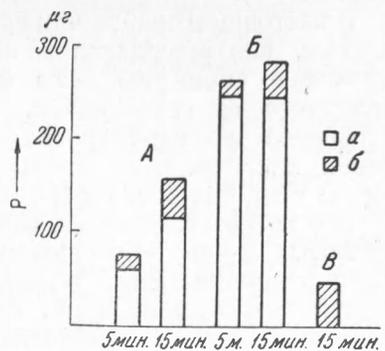


Рис. 3. Баланс фосфора при распаде глюконовой кислоты (Са-соль) и глюкозы (по 20 μM) в диализованном 3 часа мацерационном соке с добавленной АТФ (по 10 μM легко гидролизуемого Р). А — глюконат, Б — глюкоза, В — без добавлений; а + б — убыль легко гидролизуемого Р; а — прирост прочно связанного фосфора; б — прирост неорганического фосфора

видно из рис. 3, в пробе с добавленным глюконатом наблюдается убыль легко гидролизуемого фосфора АТФ, причем большая часть исчезнувшего фосфата обнаруживается к концу опыта в виде трудно гидролизуемого фосфора фосфоглюконовой кислоты (действие глюконо-

киназы, см. (1)), а меньшее количество — в виде минерального фосфата (действие аденозинтрифосфатазы). Аналогичного характера изменения наблюдаются и в пробе с добавленной глюкозой (действие гексокиназы), причем этот процесс идет еще быстрее, заканчиваясь через 15 мин.

Вышеприведенные данные свидетельствуют с несомненностью о возможности и необходимости предварительного фосфорилирования глюконовой кислоты для осуществления ее дальнейших превращений. Остается, однако, вопрос о том, осуществляется ли этот процесс под влиянием дрожжевой гексокиназы — фермента, который обладает более широким диапазоном действия, чем соответствующий фермент животных тканей, или же наблюдаемое действие принадлежит особому ферменту — глюконокиназе. Для решения этого вопроса были поставлены опыты, в которых из дрожжевого мацерационного сока была выделена и подвергнута частичной очистке гексокиназа, причем оказалось, что выделенный препарат гексокиназы, активный по отношению к глюкозе, не обладал глюконокиназной активностью. Соответствующие данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Действие частично очищенной гексокиназы на разные субстраты

Состав проб: 0,1 мл раствора гексокиназы* (=2 мг белка), $4 \cdot 10^{-3}$ M MgCl₂, $2 \cdot 10^{-3}$ M MnSO₄; по 2,5 мкг легко гидролизуемого фосфора АТФ (Са-соль) на пробу; по 2,5 мкг одного из указанных в таблице субстратов на пробу. Общий объем 1 мл. Инкубация 20 мин. при 30°

Добавленный субстрат	Убыль легко гидролизуем. Р АТФ (1)	Прирост теорг. Р (2)	Прирост трудно гидролизуем. Р (1-2)
Без добавлений	0	0	0
Глюкоза	1,5	0	1,5
Глюконовая кислота (Са-соль)	0,3	0,1	0,2
2-кетоглюконовая кислота (Са-соль)	0,2	0,1	0,1
<i>d</i> -арабиноза	0,1	0,1	0
<i>l</i> -арабиноза	0,1	0,1	0

* Гексокиназа получалась путем выделения из дрожжевого мацерационного сока белковой фракции, осаждаемой при 0,35—0,5 насыщения (NH₄)₂SO₄. Препарат хранился под 0,5-насыщенным раствором (NH₄)₂SO₄ на холоду и перед употреблением в опыте растворялся в воде.

на рис. 4. Оптимум активности гексокиназы, в соответствии с литературными данными, был найден лежащим около рН 7,5; с другой стороны, оптимум активности глюконокиназы соответствовал рН 6,0.

Обнаруженная в обычных пивных дрожжах глюконокиназа является еще одним представителем группы ферментов — киназ, число которых теперь уже приближается к 10, осуществляющих фосфорилирование гексоз и их монофосфорных дериватов. Весьма вероятным представляется наличие аналогичного фермента также и в животных тканях и, в первую очередь, в печени, относительно которой давно уже известно, что в ней имеется фермент глюкозодегидраза (8).

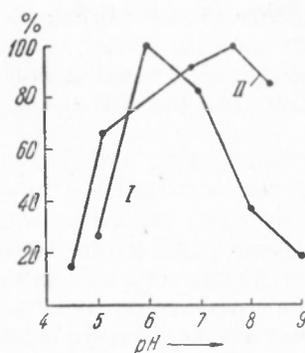


Рис. 4. Влияние рН на активность глюконокиназы (I) и гексокиназы (II). По оси ординат: активность в % от максимальной

Дальнейшее убедительное свидетельство в пользу наличия двух индивидуальных ферментов: гексо- и глюконокиназы было получено в опытах, в которых исследовалась зависимость от рН реакций переэстерификации с АТФ на глюконовую кислоту, с одной стороны, и на глюкозу, с другой. Полученные данные приведены

Несомненно, что обнаружение глюконокиназы является новым подтверждением биологической важности того пути окислительного распада гексоз, который был обозначен как апотомический ⁽⁹⁾, и весьма вероятно, что дальнейшие исследования в этой области внесут много нового в наши представления об этапах углеводного обмена в нормальных и патологических условиях.

Выражаем искреннюю благодарность чл.-корр. АН СССР В. А. Энгельгардту за ценные указания при проведении настоящей работы.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
14 VI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Энгельгардт и А. П. Бархаш, Биохимия, **3**, 500 (1938). ² А. П. Бархаш и Н. С. Демяновская, Реф. работ учр. Отд. биол. наук АН СССР за 1940 г., изд. АН СССР, 1941, стр. 119. ³ S. S. Cohen, Journ. Biol. Chem., **189**, 617 (1951). ⁴ O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Zs., **266**, 377 (1933). ⁵ O. Warburg, W. Christian u. A. Griese, *ibid.*, **282**, 157 (1935). ⁶ Н. Е. Саков, Биохимия, **6**, 163 (1941). ⁷ F. Dickens, Biochem. Journ., **32**, 1626 (1938). ⁸ D. Harrison, *ibid.*, **25**, 1016 (1931). ⁹ В. А. Энгельгардт, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 182 (1945).