БИОХИМИЯ
Т. 57, вып. 7 1992

УДК 577.152.1

© 1992 г. *Ю. Р. БОРЕЦКИЙ, Ю. С. СКОБЛОВ, О. М. ХОДОВА, П. М. РАБИНОВИЧ*

ОЧИСТКА И СВОЙСТВА GTP-ЦИКЛОГИДРОЛАЗЫ BACILLUS SUBTILIS

Ключевые слова: рибофлавин, циклогидролаза, бациллы.

Из клеток *Bacillus subtilis* посредством фракционирования экстрактов сульфатом аммония и использования ионообменной и гидрофобной хроматографии получен высокоочищенный препарат GTP-циклогидролазы. Определены N-концевая аминокислотная последовательность и общий аминокислотный состав белка. По данным электрофореза в присутствии DS-Na молекулярная масса фермента составляет 45 кДа. Активный фермент существует в нескольких формах, хорошо разделяющихся при нативном электрофорезе. Максимальная ферментативная активность обнаруживается при наличии в реакционной среде 1,5 мМ Mn^{2+}, в присутствии ионов Mg^{2+} проявляется 70% ферментативной активности. Активность фермента ингибируется ионами тяжелых металлов, хелатирующими агентами и не проявляется в отсутствие тиолвосстанавливающих соединений. Фермент активен в широком диапазоне pH с максимумом при pH 8,2. Очищен и идентифицирован пиримидиновый продукт циклогидролазной реакции – 2,5-диамино-6-окси-4-рибозиламинопиримидин-5′-фосфат. В ходе реакции из GTP образуется также пирофосфат.

Первая стадия биосинтеза рибофлавина заключается в выщеплении С-8-атома углерода из имидазольного кольца молекулы GTP. По-видимому, этот процесс является универсальным для микроорганизмов [1]. В клетках *Escherichia coli* обнаружены два фермента, обладающих GTP-циклогидролазной активностью: GTP-циклогидролаза II участвует в синтезе рибофлавина, в то время как GTP-циклогидролаза I – в синтезе фолиевой кислоты. В 1968 г. Берг и Браун предложили метод очистки и описали свойства GTP-циклогидролазы I [2]. Фермент катализирует образование неоптерина из GTP, его активность не зависит от присутствия ионов Mg^{2+} и не ингибируется при добавлении ЭДТА. В 1975 г. Фур и Браун провели аналогичные исследования с GTP-циклогидролазой II. Показано, что этот фермент катализирует образование 2,4,5-триаминопиримидинрибозо-5′-фосфата, ферментативная активность зависит от Mg^{2+} и ингибируется ЭДТА [3]. В 1976 г. Шавловский с соавт. обнаружил связанную с биосинтезом рибофлавина GTP-циклогидролазную активность у дрожжей и в 1983 г. описал свойства фермента, выделенного из *Pichia guilliermondii* [4, 5]. В 1979 г. Бреслер и Перумов обнаружили GTP-циклогидролазную активность в экстрактах клеток *Bacillus subtilis* и регуляцию синтеза фермента по механизму репрессии-дерепрессии [6].

В настоящей работе описаны метод выделения и некоторые свойства GTP-циклогидролазы, кодируемой рибофлавиновым опероном *B. subtilis*. Ранее рибофлавиновый оперон клонирован в бациллах в составе многокопийного вектора [7].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные в работе штаммы *Bacillus subtilis* представлены в табл. 1. (см. в следующем разделе). Инокулят выращивали в L-бульоне [8]. Затем культуру разводили в 50 раз средой Спицайзена [9] и инкубировали еще 9–20 ч на качалке при 37°. При выращивании штамма PJ 260/pLA44 в среды добавляли эритромицин до концентрации 20 мкг/мл. Выращенные клетки осаждали центрифугированием (15 000 g 25 мин) и хранили при –20°. Экстракты получали, обрабатывая клетки лизоцимом (см. ниже). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [10], активность GTP-циклогидролазы – по модифицированному методу Шавловского с соавт. [5]. Стандартная реакционная смесь содержала 40 мМ трис-HCl-буфер, pH 8,2, 1,5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ GTP. Белок добавляли до концентрации 0,005–0,2 мг/мл. Реакцию проводили при 37° в течение 30 мин. Затем к пробам добавляли деацетил до концентрации 0,5 мг/мл и выдерживали их при 100° в течение 30 мин. В этих условиях пиримидиновый продукт циклогидролазной реакции превращался во флуоресцирующий 6,7-диметилптерин [4], концентрацию которого определяли на флуориметре ЭФ-3М. За единицу активности GTP-циклогидролазы (Е) принимали количество фермента, обеспечивающее синтез 1 мкмоль продукта за 1 мин. Удельную активность выражали числом единиц на 1 мг белка.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [11] при 2–4°. Для определения зоны ферментативной активности гели извлекали из трубок и промывали в течение 5 мин в 40 мМ трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 4 мМ $MgCl_2$ и 10 мМ дитиотреитол. Затем столбики геля переносили в стандартную реакционную смесь и инкубировали в течение 60 мин при 37°. Затем к пробам добавляли диацетил до концентрации 1 мг/мл и выдерживали их 20 мин при 100°. Гели фотографировали в УФ.

Определение N-концевой аминокислотной последовательности. Автоматическая деградация белка проведена на секвенаторе 890В фирмы «Beckman» (США) с использованием буфера 0,25 MQ. Превращение анилинтиазолиновых производных в фенилтиогидантоины аминокислот проводили в 1 н. HCl при 80° в течение 10 мин с последующей экстракцией производных из водного растора этилацетатом. Водную фазу не анализировали. Идентификацию ФТГ-производных проводили методом HPLC на хроматографе LDC (США). Для хроматографии использована колонка Zorbax-PTH фирмы «Du Pont» (Франция) в изократическом режиме.

Аминокислотный анализ. Гидролиз белка приводили в 6 н. HCl в течение 24 ч при 110° в вакууме. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе Biotronic (ФРГ). Определение триптофана, метионина и цистина не проводили.

Диск-электрофорез в присутствии DS-Na проводили по методу Лэммли [12]. Для определения фосфатазных примесей в ферментных препаратах GTP в стандартной реакционной смеси заменяли эквивалентным количеством [γ-^{32}P]ATP. Инкубацию проводили при 37° в течение 120 мин. По окончании инкубации пробы хроматографировали на пластинках ПЭИ-целлюлозы в 0,5 М KH_2PO_4 и радиоавтографировали. Разделение флуоресцирующих веществ проводили при помощи ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (ЧСФР) либо хроматографии на бумаге Whatmann 1M («Whatmann», Англия) в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 1) (кислая система).

Анализ радиоактивных продуктов GTP-циклогидролазной реакции проводили при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках ПЭИ-целлюлозы в 0,5 М KH_2PO_4 и на пластинках Silufol UV-254. Хроматографию на пластинках Silufol проводили в кислой (см. выше) и в щелочной системе: диоксан – аммиак – вода (6 : 4 : 1). Пиримидиновый продукт реакции очищали на колонке TSK DEAE-25W.

В работе использовали GTP, трис, дитиотреитол и диацетил фирмы «Sigma» (США); остальные реактивы квалификации х. ч. и ос. ч. – отечественного производства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гены биосинтеза рибофлавина у *Bacillus subtilis* организованы в оперон, который регулируется по типу репрессии-дерепрессии. Репрессор оперона переходит в активное состояние, связываясь с рибофлавином или его производными: флавинмононуклеотидом и флавинадениндинуклеотидом [13].

По данным Бахера и соавт., в клетках бацилл с репрессируемым рибофлавиновым опероном содержание рибофлавинсинтазы в 70 раз ниже, чем в клетках штамма с конститутивным синтезом рибофлавина [14]. Бреслер и Перумов показали, что при дерепрессии rib-оперона происходит 30-кратное увеличение GTP-циклогидролазной активности [6]. Для выбора источника циклогидролазы представлялось актуальным исследовать содержание фермента в различных штаммах продуцентах витамина B_2. Для этого

Таблица 1

Штаммы Bacillus subtilis, использованные в работе

Штамм	Генотип	Происхождение
CHP 335	rib 0335	Т. П. Черник (ВНИИгенетика)
CHP1	rib C1	Т. П. Черник (ВНИИгенетика)
CHP ros	rib C1, ros	А. Я. Куканова (ВНИИгенетика)
PJ260	rib D107 recE4	Ю. В. Йомантас (ВНИИгенетика)
PJ260/pLA 44	recE4, Em, rib 0335	трансформация PJ260 плазмидой pLA44

Таблица 2

Удельная активность GTP-циклогидролазы в различных штаммах *B. subtilis*

Штамм	Фенотип системы биосинтеза B2	Количество выделяемого в среду рибофлавина, мкг/мл *	Удельная активность экстрактов, Е/мг белка·10⁻³ **
PJ260	мутация в гене редуктазы, штамм нуждается в экзогенном рибофлавине	0	не определяли
CHP01	мутация в гене-регуляторе, дерепрессия оперона	4–6	0,11
CHP335	мутация в гене операторе, дерепрессия оперона	5–7	0,12
CHPros	мутации в гене-регуляторе и операторе, дерепрессия оперона	12–15	0,32
PJ260/pLA44	дерепрессированный оперон на многокопийном векторе	50–70	1,3

* Содержание рибофлавина определяли после выращивания культур в течение 18 ч при 37° на среде Спицайзена.

** Ферментативную активность определяли в середине экспоненциальной фазы роста культур.

клетки штаммов выращивали до середины логарифмической фазы роста. Затем в экстрактах клеток определяли активность GTP-циклогидролазы. Сравнение ферментативной активности в различных штаммах бацилл свидетельствует о том, что ее уровень коррелирует с уровнем экспрессии rib-оперона (табл. 1, 2). Для выделения фермента использовали клетки штамма PJ-260/pLA44, собранные в конце логарифмической фазы роста. Наибольшая удельная активность бесклеточных экстрактов штамма наблюдается в ранней логарифмической фазе, а максимальное содержание фермента (количество единиц в 1 л культуры) — в поздней логарифмической фазе.

Очистка GTP-циклогидролазы. 7 г замороженных клеток суспендировали в 35 мл 20 мМ трис-HCl-буфера, pH 8,0, содержащего 12 мМ меркаптоэтанол, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF и 1,5 мг/мл лизоцима. Суспензию выдерживали 25 мин при 28°, добавляли 6 мл раствора ДНКазы I (1 мг/мл в 100 мМ $MgCl_2$) и инкубировали еще 5 мин при 28° для снижения вязкости. Все последующие операции проводили на холоду. Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием (20 000 g, 40 мин). Супернатант разводили в 1,5 раза 40 мМ трис-HCl-буфером, содержащим 2 мМ ЭДТА, 12 мМ МЭ, 1 мМ PMSF, pH 8,0; затем добавляли сульфат аммония до насыщения 25%. Через 1,5 ч образовавшийся осадок удаляли центрифугированием (15 000 g, 40 мин). К супернатанту добавляли сульфат аммония до насыщения 42% и оставляли на ночь. На следующий день осадок отделяли центрифугированием (15 000 g, 60 мин) и растворяли в 4 мл раствора 20 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 12 мМ МЭ, pH 8,0 (буфер А). Раствор диализовали 5–6 ч против 500 мл буфера А, не содержащего

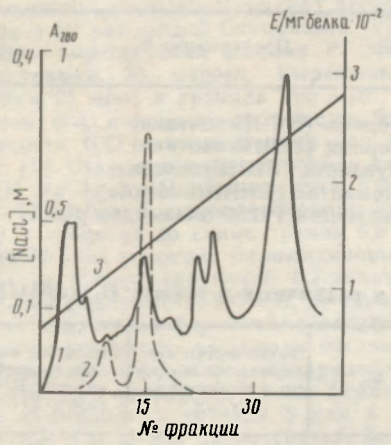

Рис. 1

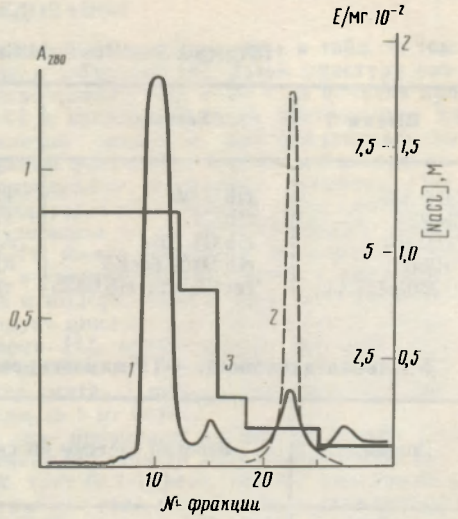

Рис. 2

Рис. 1. Хроматография высоленной GTP-циклогидролазы на DEAE-Toyopearl: *1* – оптическая плотность при 280 нм; *2* – активность GTP-циклогидролазы, *3* – градиент NaCl, скорость элюции – 7,5 мл/ч, объем градиента 200+200 мл, объем фракций 5 мл

Рис. 2. Хроматография GTP-циклогидролазы на Phenyl-сефарозе CL-6B: *1* – оптическая плотность при 280 нм, *2* – активность GTP-циклогидролазы, *3* – градиент NaCl, скорость элюции 3 мл/ч, объем фракций 2 мл

PMSF; нерастворимый осадок удаляли центрифугированием, а супернатант использовали для хроматографии на DEAE-Toyopearl. Супернатант разводили буфером А до концентрации белка 7–8 мг/мл и наносили на колонку DEAE-Toyopearl (1,6×15 см), уравновешенную буфером Б (20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ NaCl, 12 мМ меркантоэтанол, 1 мМ ЭДТА). Колонку промывали 15 мл буфера Б и затем элюировали фермент линейным градиентом 0,08–0,40 М NaCl в том же буфере. Результаты хроматографии представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, фермент элюировался с колонки в виде двух пиков, содержащих соответственно ~15 и 85% суммарной активности фракции второго пика, содержащие фермент в количестве не менее 10% от максимальной активности, объединяли, добавляли сульфат аммония до насыщения 42%. Через 2 ч суспензию центрифугировали (20 000 g, 40 мин). Осадок суспендировали в 1 мл буфера А и выдерживали 1,5 ч до растворения. Нерастворимые частицы удаляли центрифугированием (20 000 g, 40 мин). К супернатанту добавляли NaCl до концентрации 1,2 М и наносили на колонку фенилсефарозы CL-4B (0,8×9 см), промывали буфером Б, содержащим 1,2 М соли, и смывали снижающимся

Таблица 3

Очистка GTP-циклогидролазы B. subtilis

Этапы очистки	Белок, мг	Активность, $E \cdot 10^{-3}$		Выход, %	Степень очистки
		удельная, Е/мг	общая, Е		
Бесклеточный экстракт	435	1,4	609	–	–
Фракционирование сульфатом аммония	78	7,84	611	100,5	5,6
Анионообменная хроматография	13,2	24,64	324	53,2	17,6
Гидрофобная хроматография	2,1	87	182	29,9	62,1

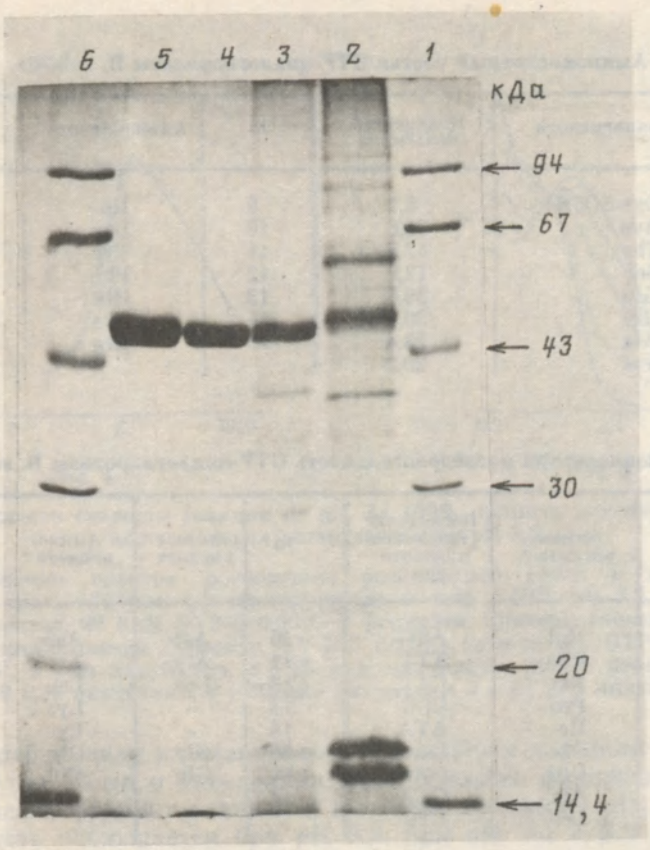

Рис. 3. Электрофорез в присутствии DS-Na препаратов GTP-циклогидролазы на различных этапах очистки: *1, 6* – маркерные белки; *2* – клеточный экстракт pJ260/pLA44; *3* – фермент, полученный после осаждения сульфатом аммония; *4* – препарат, полученный после ионообменной хроматографии и повторного высаливания сульфатом аммония; *5* – препарат, полученный после хроматографии на Phenyl-сефарозе

ступенчатым градиентом NaCl. Результаты хроматографии представлены на рис. 2. В итоге был получен гомогенный препарат GTP-циклогидролазы. Выход фермента составляет 30% (табл. 3).

Электрофореграмма препаратов фермента, полученных на разных стадиях выделения, представлена на рис. 3. В процессе очистки увеличивается содержание белка с молекулярной массой ~45 кДа, последний этап очистки дает электрофоретически гомогенный препарат. Электрофорез нативного белка показал, что очищенный фермент обладает способностью агрегировать с потерей ферментативной активности. В клеточном экстракте кроме основной присутствуют еще две активные формы фермента, различающиеся по электрофоретической подвижности. После высаливания сульфатом аммония, а также при длительном хранении (4–5 дней при 4°) в экстракте активны основная и одна из дополнительных форм.

Препараты фермента, получаемые на промежуточных стадиях очистки, нестабильны. Например, препарат, полученный после ионообменной хроматографии, теряет 50% активности в течение 5–6 дней. Большие потери активности (~30%) наблюдаются также при повторном высаливании

Таблица 4

Аминокислотный состав GTP-циклогидролазы B. subtilis

№	Аминокислота	Количество, моль/моль	№	Аминокислота	Количество, моль/моль
1	Cys-SO3H	5,2	9	Ile	17,6
2	Asp	35,6	10	Leu	33,8
3	Thr	17,8	11	Tyr	7,3
4	Ser	12,6	12	Phe	11,4
5	Glu	39,8	13	His	16,1
6	Gly	30,4	14	Lys	19,2
7	Ala	28,4	15	Arg	17,4
8	Val	20,2			

Таблица 5

N-Аминокислотная последовательность GTP-циклогидролазы B. subtilis

№	Аминокислота	Аминокислота *	Последовательность нуклеотидов *	№	Аминокислота	Аминокислота *	Последовательность нуклеотидов *
1	Met	Met	ATG	10	Asp	Asp	GAC
2	Phe	Phe	TTT	11	Ala	Ala	GCT
3	–	His	CAT	12	Leu	Leu	TAA
4	Pro	Pro	CCG	13	–	Lys	AAA
5	Ile	Ile	ATA	14	–	Lys	AAA
6	Glu	Glu	GAA	15	Gly	Gly	GGC
7	Glu	Glu	GAA	16	Glu	Glu	GAA
8	Ala	Ala	GCA	17			GTC
9	Leu	Leu	CTG				

* Последовательность аминокислот во второй колонке приведена согласно последовательности нуклеотидов рибофлавинового оперона B. subtilis [15].

сульфатом аммония. В то же время очищенный препарат, элюированный с фенилсефарозы, теряет не более 40% активности в течение 30 дней хранения при 4°.

Результаты аминокислотного анализа очищенной GTP-циклогидролазы представлены в табл. 4. Достигнутая в ходе выделения чистота препарата позволила провести определение N-концевой аминокислотной последовательности. При деградации интактного белка было определено 16 аминокислотных остатков с хорошим выходом (табл. 5). Анализ подтвердил гомогенность препарата. Остатки 3, 13 и 14 идентифицировать не удалось, возможно, из-за наличия аминокислот, не определяемых в органической фазе. Проведено сравнение данной аминокислотной последовательности с последовательностью, определенной после секвенирования рибофлавинового оперона [15]. В цитируемой работе в составе рибофлавинового оперона обнаружено пять рамок трансляции (ОРТ). Аминокислотная последовательность GTP-циклогидролазы имеет высокую гомологию с ОРТ-3. Из сравнения указанных последовательностей очевидно, что в положении 3 находится гистидин, а в положениях 13 и 14 – лизин. Для циклогидролаз других организмов N-концевая аминокислотная последовательность не известна.

Для определения pH-оптимума pH трис-буфера в стандартной реакционной смеси варьировали в интервале 6,5–10,5. Пробы после добавления белка перемешивали и инкубировали 120 мин при 37°. Через 30, 60 и 90 мин отбирали аликвоты по 150 мкл, добавляли 100 мкл 1 М трис-HCl,

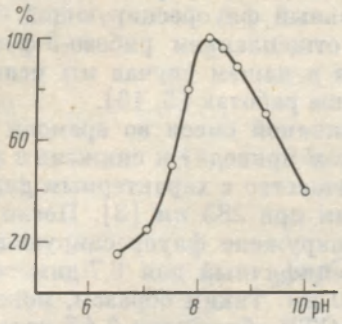

Рис. 4

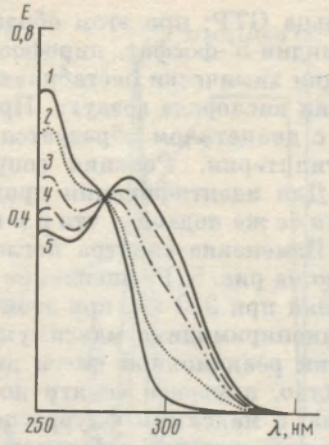

Рис. 5

Рис. 4. Зависимость скорости реакции от pH. За 100% принята максимальная активность, которая достигается при pH 8,2

Рис 5. Изменение спектра поглощения реакционной смеси в ходе реакции. Реакционная смесь объемом 1,5 мл содержала 40 мМ T-HCl, pH 8,2, 2 мМ $MgCl_2$, 5 мМ дитиотреитол, 60 мкМ GTP и 0,0015 E фермента. Спектры записывали на двулучевом спектрофотометре Shimadzu UV 240 против кюветы без GTP. Температура инкубации 28°. *1* – до инкубации, *2* – 15 мин инкубации (после добавления GTP), *3* – 40 мин инкубации, *4* – 60 мин инкубации, *5* – 80 мин инкубации

pH 8,0, и обрабатывали их диацетилом. Затем объем доводили 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, до 10 мл и определяли интенсивность флуоресценции. Как видно из рис. 4, фермент активен в широком диапазоне pH. Максимальная активность наблюдается при pH 8,2, при pH 7,4 и 9,3 наблюдается двукратное снижение активности.

В реакционной смеси без дитиотреитола определяется не более 2–3% ферментативной активности. Оптимальная концентрация дитиотреитола составляет 3 мМ.

Для определения зависимости ферментативной активности от различных двухвалентных катионов ими замещали ионы магния в стандартной реакционной смеси. После добавления исследуемых катионов до концентрации 2 мМ пробы инкубировали при 37° в течение 30, 60 и 90 мин. Реакцию останавливали обработкой диацетилом. Наибольшая скорость реакции наблюдается в присутствии ионов Mn^{2+}. В сравнении с этим уровнем, принимаемым за 100%, скорость реакции в присутствии других ионов составляет соответственно: Mg^{2+} – 70%, Ca^{2+} – 15%, Ni^{2+} – 3,7%, Co^{2+} – 2%, Cu^{2+} и Zn^{2+} – 0%. При этом повышенные концентрации ионов марганца (более 2,5 мМ) ингибируют ферментативную активность.

Максимум активности фермента определяется при концентрации NaCl 0,2 М. Дальнейшее повышение ионной силы угнетает ферментативную активность.

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата имеет кривую, подчиняющуюся кинетике Михаэлиса – Ментен. Значение K_m в присутствии магния составляет 80 мкМ, а в присутствии марганца – 50 мкМ. Максимальная активность достигалась при концентрации GTP 230 и 200 мкМ соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата не приводило к возрастанию скорости реакции.

Изучение продуктов GTP-циклогидролазной реакции. GTP-Циклогидролаза II *E. coli* [3], а также аналогичные GTP-циклогидролазы дрожжей [5, 16] катализируют выщепление C-8-атома углерода из имидазольного

кольца GTP; при этом образуются 2,5-диамино-6-окси-4-рибозиламинопиримидин-5′-фосфат, пирофосфат и формиат. Пиримидиновый продукт реакции химически нестабилен и быстро разрушается на свету или в присутствии кислорода воздуха. При конденсации этого 2,4,5-триаминопиримидина с диацетилом образуется более стабильный флуоресцирующий 6,7-диметилптерин. Реакция сопровождается отщеплением рибозо-5-фосфата.

Для идентификации продукта реакции в нашем случае мы использовали те же подходы, что и в названных выше работах [3, 16].

Изменение спектра поглощения реакционной смеси во времени показано на рис. 5. Расщепление GTP ферментом приводит к снижению поглощения при 253 нм, при этом образуется вещество с характерным для триаминопиримидина максимумом поглощения при 285 нм [3]. После обработки реакционной смеси диацетилом обнаружено флуоресцирующее вещество, имеющее спектр поглощения, специфичный для 6,7-диметилптерина, и максимум флуоресценции при 440 нм. Таким образом, можно заключить, что под действием фермента из GTP образуется 2,4,5-триаминопиримидин, который при конденсации с диацетилом превращается в 6,7-диметилптерин.

Для обнаружения сахарофосфатной группы пиримидиновый продукт GTP-циклогидролазной реакции очищали при помощи ионообменной ВЭЖХ. В стандартную реакционную смесь, содержащую [α-^{33}P]GTP, добавляли фермент и перемешивали. Одну часть пробы немедленно наносили на ионообменную колонку TSK DEAE-25W, а оставшуюся часть инкубировали 30 мин при 37°. После 30-минутной инкубации смесь хроматографировали на той же колонке в аналогичных условиях. Результаты хроматографии представлены на рис. 6. В итоге в опытной пробе было обнаружено вещество, имеющее подвижность большую, чем GMP, и более высокое отношение поглощения 280 : 260, что характерно для триаминопиримидина. Измерение радиоактивности фракций показывает, что в ходе реакции радиоактивность из [α-^{33}P]GTP переходит в пиримидиновый продукт. Наличие радиоактивности и время удерживания этого пиримидина на колонке позволяют заключить, что в его структуре есть отрицательно заряженная группа. По-видимому, образующийся пиримидин сохраняет сахарофосфатную часть из GTP. После обработки диацетилом анализ фракций, содержащих образовавшийся пиримидин, проводили при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках с силуфолом. При хроматографии в щелочной системе обнаружено радиоактивное вещество, дающее характерные для сахаров реакции окрашивания и идентичное по подвижности рибозо-5-фосфату. При хроматографии в кислой системе обнаружено флуоресцирующее вещество, идентичное 6,7-диметилптерину по подвижности и спектру поглощения. Исходя из этого, можно заключить, что в ходе реакции из GTP под действием GTP-циклогидролазы из *B. subtilis* образуется 2,5-диамино-6-окси-4-рибозиламинопиримидин-5-фосфат. Следовательно, циклогидролазная реакция сопровождается гидролизом трифосфатной цепи GTP. Для определения продуктов гидролиза GTP ферментом в качестве субстрата использовали [γ-^{32}P]GTP. После добавления фермента пробы инкубировали при 37°. Через 20 и 80 мин отбирали аликвоты и наносили на пластинки SILUFOL UV-254 и ПЭИ-целлюлозы. В качестве контроля использовали меченые пирофосфат, ортофосфат и GTP. Анализ реакционных смесей на ТСХ в двух системах показал образование [^{32}P]пирофосфата. Таким образом, мы идентифицировали два продукта GTP-циклогидролазной реакции: 2,5-диамино-6-окси-4-рибозиламинопиримидин-5-фосфат и пирофосфат.

Как известно, GTP-циклогидролазы представляют группу ферментов, которые катализируют первый этап биосинтеза некоторых гетероциклических соединений [3, 5, 17, 18]. Наиболее изученными являются фермен-

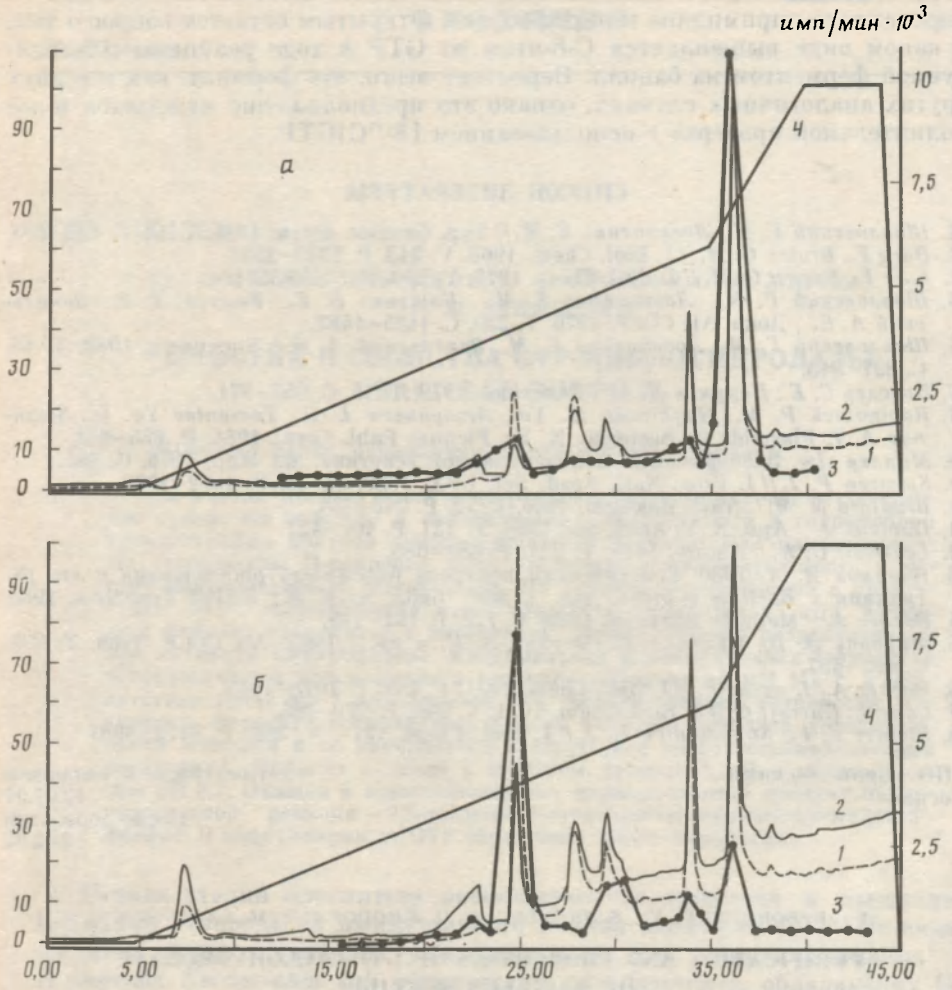

Рис. 6. Хроматография реакционной смеси с [α-³³P] на колонке TSK DEAE-25W. Реакционная смесь объемом 0,4 мл содержала 40 мМ T-HCl, pH 8,2, 1,5 мМ MgCl, 12.5 мМ меркаптоэтанол, 500 мкМ [α-³³P]GTP (100 мкКи) и 0,001 Е фермента. $T=37°$. К 40 мкл смеси добавляли 360 мкл 0,1 М ацетата натрия, pH 5,0, наносили на колонку и элюировали градиентом 0,1–1 М ацетатом натрия с 50 мМ меркаптоэтанолом. Скорость элюции – 0,5 мл/мин. Объем фракций – 0,5 мл. Радиоактивность фракций измеряли в счетчике Rack-Beta 1217 («LKB», Швеция). После хроматографии колонку промывали 1 М буфером, уравновешивали 0,1 М ацетатом натрия и использовали для хроматографии опытного образца. *а* – реакционная смесь до инкубации, *б* – реакционная смесь после 30 мин инкубации при 37°. *1* – оптическая плотность при 280 нм, *2* – оптическая плотность при 260 нм, *3* – радиоактивность фракций, *4* – градиент концентрации ацетата натрия

ты из кишечной палочки и дрожжей, участвующие в биосинтезе рибофлавина [3, 5]. Так же как и эти ферменты, GTP-циклогидролаза из *B. subtilis* проявляет строгую субстратную специфичность по отношению к GTP. В отличие от двух других аналогичных ферментов GTP-циклогидролаза из бацилл более активна в присутствии ионов марганца. По молекулярной массе GTP-циклогидролаза бацилл близка к ферменту из кишечной палочки. По данным электрофореза в денатурирующих условиях ее молекулярная масса составляет ~45 кДа. Все три GTP-циклогидролазы, вовлеченные во флавиногенез, катализируют образование из GTP фосфорил-

лированного пиримидина и пирофосфата. Открытым остается вопрос о том, в каком виде выщепляется С-8-атом из GTP в ходе реакции, катализируемой ферментом из бацилл. Вероятнее всего, это формиат, как и в двух других аналогичных случаях, однако это предположение нуждается в дополнительной проверке с использованием [8-^{14}C]GTP.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М.* // Укр. биохим. журн. 1984. Т. 56. С. 689–698.
2. *Burg F., Brown G. M.* // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 2349–2358.
3. *Foor F., Brown G. M.* // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 3545–3551.
4. *Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М., Кащенко В. Е., Колтун Л. В., Закальский А. Е.* // Докл. АН СССР. 1976. Т. 230. С. 1485–1487.
5. *Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М., Закальский А. Е.* // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 837–843.
6. *Бреслер С. Е., Перумов Д. А.* // Генетика. 1979. Т. 15. С. 957–971.
7. *Rabinovich P. M., Haykinson M. Ya., Arutyunova L. S., Yomantas Yu. V., Stepanov A. I.* Plasmids in Bacteria. N. Y.: Plenum Publ. Corp., 1984. P. 635–656.
8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. С. 395.
9. *Spizizen P. J.* // J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1958. № 44. P. 1072–1078.
10. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. 1986. V. 72. P. 248–254.
11. *Davis B. J.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404–427.
12. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
13. *Перумов Д. А.* 1980. Генетический контроль биосинтеза рибофлавина и его регуляция у *Bacillus subtilis*. Дис. ... докт. биол. наук. М.: ВНИИ Генетика, 1980.
14. *Bacher A.* // Methods Enzymol. 1986. V. 122. P. 192–199.
15. *Миронов В. Н., Краев А. С., Чернов Б. К. и др.* // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. С. 482–487.
16. *Bacher A., Lingens F.* // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 7018–7022.
17. *Cone J., Gurroff G.* // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 979–985.
18. *Elstner E. F., Suhadolnick R. J.* // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 6973–6981.

НПО «Биотехнология»,
Москва

Поступила в редакцию
12.07.91
После доработки
12.02.92

Yu. R. BORETSKY, Yu. S. SKOBLOV, O. M. KHODOVA, P. M. RABINOVICH

PURIFICATION AND PROPERTIES OF GTP-CYCLOHYDROLASE OF BACILLUS SUBTILIS

«Biotechnology» Scientific-Industrial Corporation, Moscow

Key words: riboflavin, cyclohydrolase, bacilli.

Highly purified GTP-cyclohydrolase was obtained by fractionation of cell extracts with ammonium sulfate, ion-exchange and hydrophobic chromatography. The N-terminal amino acid sequence and amino acid composition of the protein were determined. According to SDS-PAGE data, the molecular weight of the enzyme is 45 kDa. The active enzyme has several isoforms separable by native electrophoresis. The maximal enzyme activity is determined at 1.5 mM Mn^{2+}; 70% of enzymatic activity is detected with Mg^{2+}. The enzyme is inhibited by heavy metal ions and chelators and is inactive in the absence of thiol-reducing agents. The enzyme activity is detected in a broad range of pH with a maximum at pH 8.2. The pyrimidine product of the GTP-cyclohydrolase reaction, 2,5-diamino-6-hydroxy-4-ribosylaminopyrimidine-5′-phosphate was purified and identified. Another product of this reaction is pyrophosphate.