

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Л. П. ЛОСЕВА

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА L-ТРЕОНИНДЕГИДРАТАЗЫ AZOTOBACTER VINELANDII

В нашей предыдущей статье (1), посвященной L-треониндегидратазе *Azotobacter vinelandii*, было показано, что фермент, содержащийся в надосадочной жидкости после центрифугирования при 140 000 g, является биосинтетическим, т. е. ингибируется L-изолейцином. Зависимость скорости реакции от концентрации ингибитора при pH 9,1 выражалась S-образной кривой, в то время как зависимость скорости реакции от концентрации субстрата при том же значении pH подчинялась кинетике Михаэлиса — Ментен. Так как реакцию проводили с неочищенными ферментными экстрактами, то можно было думать, что гиперболический характер кривой насыщения фермента субстратом, возможно, является следствием взаимодействия фермента с находящимся в экстракте активатором. В связи с этим необходимо было фермент из экстракта подвергнуть очистке и исследовать кинетику его действия, что и составило задачу данной работы.

Для выделения L-треониндегидратазы использовали 24-часовую культуру *A. vinelandii*, выращенную при энергичной аэрации на модифицированной среде Берка (2). Отделенную от культуральной среды клеточную пасту суспендировали в 0,05 M K-фосфатном буфере (pH 7,5) в отношении 1 : 2 с добавлением цистеина (1 мг/мл). Затем порции по 50 мл подвергали озвучиванию в течение 3,5 мин. на дезинтеграторе MSE-500 вт (20 килоциклов в 1 сек.). Осветленный центрифугированием при 18 000 g в течение 30 мин. исходный экстракт подвергали ультрацентрифугированию при 140 000 g в течение 60 мин. для удаления субклеточных структур. Полученный супернатант фракционировали сульфатом аммония согласно номограмме Брновицкой и Горетова (3). Большая часть активности (80%) находилась во фракции от 30 до 45% насыщения. Активную фракцию, предварительно обессоленную на колонке с Сефадексом Г-25, хроматографировали на колонке с Сефадексом Г-200 (3,1 × 62 см). С колонки L-треониндегидратазная активность выходила одним пиком, причем удельная активность конечного препарата была в 20 раз выше активности исходного экстракта.

Об активности L-треониндегидратазы судили по образованию аммиака, который определяли микродиффузионным методом (4). К реакционной смеси в общем объеме 1 мл, содержащей K-фосфатный или трис-фосфатный буфер (150 мкмол.), пиридоксальфосфат (20 мкг), L-треонин (в указанных концентрациях) и в опытах по ингибированию — L-изолейцин, добавляли от 16 до 20 мкг белка, содержащегося в 0,02 мл. Контролем служила реакционная смесь, содержащая все компоненты за исключением L-треонина. Активность выражали в микромолях NH₃, образовавшегося за 20 мин. при 37°.

Для L-треониндегидратаз бактериального происхождения характерен оптимум pH, лежащий в пределах от 8,5 до 10,5. Примером может служить биодеградативная L-треониндегидратаза из *Clostridium tetanomorphum* (5) и биосинтетическая из *Salmonella typhimurium* (6). Оптимум pH L-треониндегидратазы *A. vinelandii* находился тоже в пределах этой зоны, однако было замечено, что оптимум менялся с изменением концентрации субстрата. На рис. 1 представлены две кривые зависимости скорости дезаминирования от pH, полученные в присутствии 4 и 40 мкмол.

L-треонина. Кривая 1, полученная в присутствии 4 $\mu\text{мол.}$ *L*-треонина, по форме симметрична и имеет оптимум pH 9,1, в то время как кривая 2 (40 $\mu\text{мол.}$ *L*-треонина) асимметрична, причем максимальная скорость достигалась при pH 10,1. Это явление можно попытаться объяснить следующим образом: с одной стороны, щелочная среда способствует протеканию ферментативной реакции, но с другой — может вызвать конформационные изменения в молекуле фермента, которые в ряде случаев приводят к диссоциации фермента на субмолекулы. Как показали Ванквикенбори и Филлипс (7) на примере биодegradативной *L*-треониндегидратазы из *Cl. tetanomorphum*, увеличение pH с 8,6 до 9,4 вызывало диссоциацию фермента, причем в трибуфере она шла сильнее, чем в фосфатном. Восстановление нативной структуры фермента происходило при добавлении АДФ (аллостерического активатора) или *L*-треонина до концентрации 50 мМ. В случае *L*-треониндегидратазы *A. vinelandii* концентрация субстрата 4 мМ являлась недостаточной для сохранения нативной конформации фермента, поэтому уже при значении pH выше 9,1 наблюдали снижение активности фермента (кривая 1). В присутствии 40 мМ

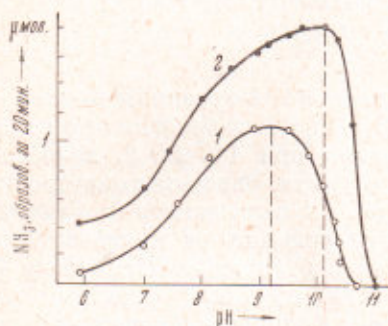


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от pH для двух концентраций *L*-треонина ($\mu\text{мол.}$): 1 — 4, 2 — 40

L-треонина происходила стабилизация нативной структуры, вследствие чего даже при pH выше 9,1 скорость дезаминирования увеличивалась и росла вплоть до pH 10,1, выше которого резко падала. Возможно, что *L*-

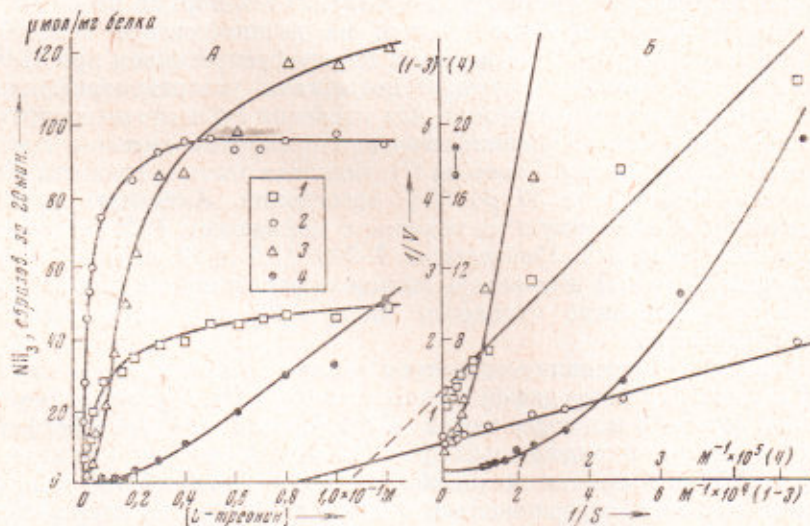


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации *L*-треонина при различных pH (А) и те же данные, представленные в координатах Лайнуивера — Берка (Б). 1 — pH реакционной смеси 7,6; 2 — pH 9,1; 3 — pH 10,25; 4 — pH 10,6

треонин помимо его основной роли в качестве субстрата выполняет роль стабилизатора нативной конформации.

Кроме рассмотренной выше зависимости скорости дезаминирования от концентрации водородных ионов, нами изучалась зависимость скорости реакции от концентрации субстрата при различных значениях pH. Мы не

нашли различия в кинетике насыщения фермента субстратом при рН 9,1 между ферментом исходного экстракта и ферментом, очищенным в 20 раз: форма кривой осталась гиперболической (рис. 2А). По-видимому, при этом значении рН фермент находится в активном состоянии, и гиперболическая форма кривой не является результатом взаимодействия фермента с активатором. Заметные отклонения от кинетики Михаэлиса — Ментен наблюдали, если рН реакционной смеси изменялся в более кислую или в более щелочную от рН 9,1 сторону. Для рН 10,25 и 10,6 форма кривой насыщения фермента субстратом становилась S-образной (рис. 2А), а графики двойных обратных величин показывали характерные для таких кривых загибы вверх (рис. 2Б), причем коэффициенты кооперативности, рассчитанные из графиков Хилла, превышали единицу и были равны 1,4 и 1,7 соответственно. Появление S-образной формы кривых насыщения фермента субстратом с возрастанием рН наблюдали на биосинтетической *L*-треониндегидратазе из дрожжей Робинсон-Шульмайстер и Маги (8).

Согласно модели Моно и др. (9), S-образная форма кривой зависимости V от $[S]$ отражает кооперативные взаимодействия центров связывания субстрата. Однако в появившихся в последнее время работах указывается, что наличие сигмоидности не является достаточным критерием для того, чтобы говорить о кооперативном взаимодействии центров, так как целый ряд явлений, не связанных с кооперативным взаимодействием центров, может давать сигмоидные кривые (10-12). В нашем случае S-образная форма кривых зависимости V от $[S]$ появляется при рН > 10, где возможна диссоциация фермента, а потому S-образность может оказаться следствием указанного выше явления стабилизации нативной конформации высокими концентрациями субстрата.

Отклонение от кинетики Михаэлиса — Ментен находим у кривой, полученной при рН 7,6 (рис. 2А, Б). По виду она напоминает гиперболу, но на графике двойных обратных величин имеет загиб вниз, а коэффициент кооперативности по Хиллу меньше единицы (0,7). Эти признаки служат косвенным указанием на существование отрицательных кооперативных взаимодействий между центрами связывания субстрата. Это явление было открыто Кошлендом и кинетические проявления показаны им на ряде дегидрогеназ (13). Разнообразное кинетическое поведение фермента, наблюдаемое с изменением рН, может являться, по мнению Далзиела, результатом конформационных изменений белковой молекулы (14).

В связи с тем, что биосинтетическая *L*-треониндегидратаза является очень лабильным ферментом и в первую очередь теряет чувствительность к ингибитору (15), мы сочли необходимым проверить реакцию очищенного фермента на возрастающие концентрации ингибитора. На рис. 3 представлена зависимость скорости реакции от концентрации *L*-изолейцина при рН 9,2 для нескольких определенных концентраций *L*-треонина. Кривая, полученная с 20 $\mu\text{мол}$. *L*-треонина, имеет S-образный характер, а концен-

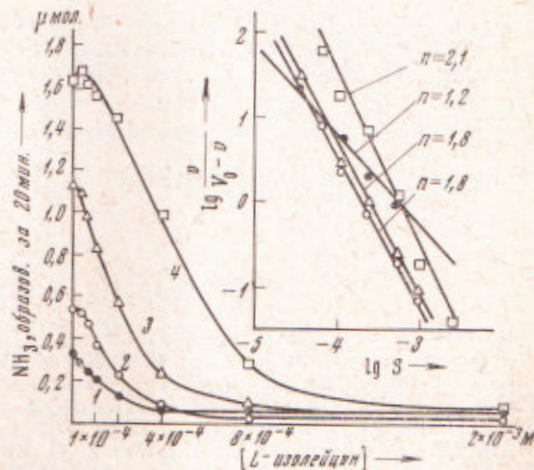


Рис. 3. Зависимость скорости реакции от увеличивающихся концентраций ингибитора для нескольких определенных концентраций *L*-треонина ($\mu\text{мол}$): 1 — 1, 2 — 2, 3 — 4, 4 — 20. рН реакционной смеси 9,2. Вверху — графики Хилла этих кривых и указаны коэффициенты кооперативности, рассчитанные из графиков

трация ингибитора $2 \cdot 10^{-3}$ M подавляет активность на 96%, что наблюдалось также в случае исходного экстракта. Таким образом, в данном случае очистка не изменила чувствительности к изолейцину. Интересно отметить, что уменьшение концентрации *L*-треонина приводит к увеличению чувствительности к ингибитору и к изменению формы кривой, которая из S-образной становилась гиперболической при концентрации *L*-треонина равной 1,0 μ мол., а коэффициент кооперативности снижался с 2,1 до 1,2. Такое уменьшение последнего для кривых ингибирования при уменьшении концентрации субстрата указывает на существование гетеротропных взаимодействий между центрами связывания субстрата и ингибитора (9).

Таким образом, полученные нами данные показывают, что кинетика действия биосинтетической *L*-треониндегидратазы азотобактера меняется в зависимости от pH среды. Фермент имеет оптимум pH, зависящий от концентрации *L*-треонина, и проявляет гетеротропные взаимодействия.

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

Поступило
19 III 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. П. Лосева, В. И. Любимов и др., ДАН, 181, 997 (1968). ² Н. Д. Иерусалимский, Г. Н. Зайцева, И. А. Хмель, Микробиология, 31, № 3, 417 (1962). ³ З. С. Броновицкая, В. П. Горетов, Прикл. биохим. и микробиол., 3, 707 (1967). ⁴ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Б. Э. Кирштейне, Прикл. биохим. и микробиол., 4, в. 1, 120 (1968). ⁵ H. R. Whiteley, M. Tahara, J. Biol. Chem., 241, № 21, 4881 (1966). ⁶ R. O. Burns, H. Zarlengo, J. Biol. Chem., 243, № 1, 178 (1968). ⁷ A. Vanquickenborne, A. T. Phillips, J. Biol. Chem., 243, № 6, 1312 (1968). ⁸ H. de Robichon-Szulmajster, P. T. Magee, European J. Biochem., 3, № 4, 492 (1968). ⁹ J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, J. Mol. Biol., 12, 88 (1965). ¹⁰ J. R. Sweeny, J. R. Fisher, Biochemistry, 7, № 2, 561 (1968). ¹¹ W. Hardling, Arch. Biochem. and Biophys., 129, № 1, 57 (1969). ¹² D. T. Dennis, Biochim. et biophys. acta, 191, № 3, 719 (1969). ¹³ A. Conway, D. E. Koshland jr., Biochemistry, 7, № 11, 4011 (1968). ¹⁴ K. Dalziel, FEBS Letters, 1, № 5, 346 (1968). ¹⁵ J.-P. Changeux, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 313 (1961).