

Г. Я. ВИДЕРШАЙН

**О ВЗАИМОСВЯЗИ β -D-ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ
И β -D-ФУКОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ В ОРГАНИЗМЕ
ЖИВОТНЫХ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 26 II 1973)

Как известно, в организме животных различные углеводсодержащие соединения содержат в своем составе *L* изомер фукозы (¹). Несмотря на отсутствие у животных *D*-фукозы, у них обнаружена высокая β -*D*-фукозидазная активность (²). До настоящего времени не решен вопрос о том, обусловлена ли β -*D*-фукозидазная активность наличием у животных самостоятельного фермента или она связана с β -*D*-галактозидазой, которая, как можно предполагать, способна отщеплять не только *D*-галактозу, но и *D*-фукозу, вследствие очень близкого структурного сходства этих сахаров (³⁻⁶).

Ранее нам удалось обнаружить четыре формы β -*D*-галактозидазы в ферментном препарате из почки свиньи (⁷). При наличии в исходном препарате β -*D*-фукозидазной активности представлялось интересным выяснить ее отношение к тем или иным формам β -*D*-галактозидазы и провести сравнительное исследование обеих активностей, что является предметом настоящей работы.

В работе использовали продажные препараты субстратов и ингибиторов с высокой степенью очистки. *n*-Нитрофенил- β -*D*-фукозид был любезно предоставлен нам доктором Д. Кончи (Абердин, Великобритания).

Ферментные препараты получали из почки свиньи по методу, описанному ранее (⁷). Ферментативную активность измеряли по количеству *n*-нитрофенола, отщепляющегося при ферментативном гидролизе соответствующих *n*-нитрофенилгликозидов. Количество *n*-нитрофенола определяли на спектрофотометре СФ-4А при 400 мμ в щелочной среде (рН 10,5).

За единицу активности гликозидаз принимали такое количество фермента, которое расщепляло 1 нмоль соответствующего гликозида за 1 час.

О ферментативном расщеплении лактозы судили по определению в смеси свободной глюкозы с помощью глюкозооксидазы при 620 мμ (⁸). Белок определяли по методу Лоури (⁹). Условия гельфильтрации ферментных препаратов из почки свиньи на 3 последовательно соединенных колонках с сефадексом Г-200 (1,8 × 100 см каждая) приведены в предыдущем сообщении (⁷).

На рис. 1 представлен элюиционный профиль β -*D*-галактозидазной и β -*D*-фукозидазной активностей, при гельфильтрации исходного ферментного препарата из почки свиньи на колонке с сефадексом Г-200. Как видно, β -*D*-галактозидазная активность характеризовалась четырьмя пиками при использовании в качестве субстрата синтетического галактозида. Лактоза гидролизалась во фракциях, соответствующих первым трем пикам и не расщеплялась фракциями четвертого пика с наибольшей галактозидазной активностью.

Исследование β -*D*-фукозидазной активности показало, что β -*D*-фукозид расщеплялся только во фракциях четвертого пика. При этом характер элюиционного профиля β -*D*-фукозидазной активности был совершенно идентичен элюиционному профилю четвертого пика β -*D*-галактозидазы.

Ниже представлены данные сравнительного изучения свойств β -D-галактозидазы и β -D-фукозидазы при использовании в качестве ферментных препаратов объединенных фракций четвертого пика (№ 225—240).

Оптимум pH при расщеплении β -D-галактозида и β -D-фукозида характеризовался довольно широкой областью от 4,5 до 7,5. Как видно из рис. 2а при других значениях pH характер изменения обеих активностей был

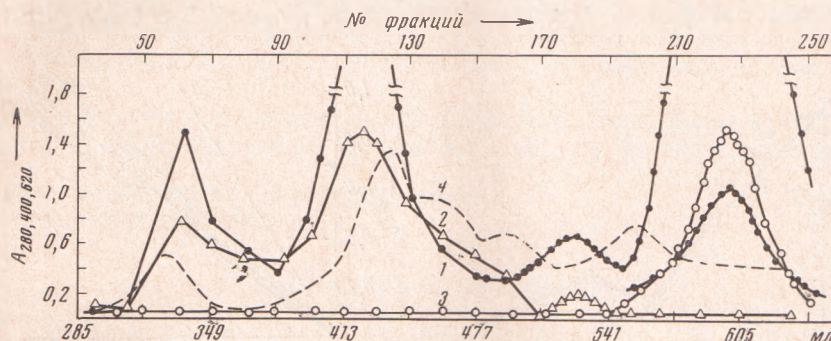


Рис. 1. Элюционный профиль β -D-галактозидазной (1 — по галактозиду, 2 — по лактозе) и β -D-фукозидазной (3) активностей при гельфильтрации на сефадексе Г-200. 4 — белок при 280 мμ

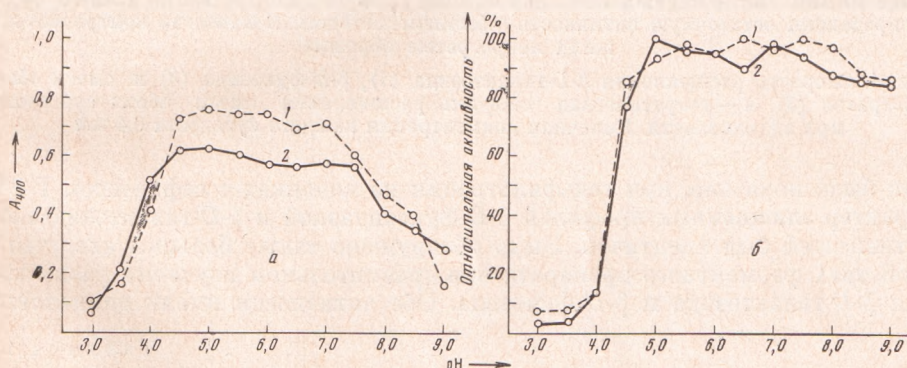


Рис. 2. Влияние pH на β -D-галактозидазную (1) и β -D-фукозидазную (2) активности (а) и pH-стабильность ферментного препарата по β -D-фукозидазным — 2 (б)

очень сходен. Такое же сходство было обнаружено при исследовании pH-стабильности β -D-галактозидазной и β -D-фукозидазной активностей (рис. 2б). Обе активности практически инактивировались при выдерживании препаратов при pH 3,0 в течение 1 часа (37°) и сохранялись почти полностью при выдерживании в области pH от 5,0 до 8,0. Влияние температуры на изменение β -D-галактозидазной и β -D-фукозидазной активностей показано на рис. 3. Незначительные различия в расщеплении субстратов обнаружены лишь при 45°. Прогревание ферментных препаратов при других значениях температуры (50, 55, 60 и 70°) дает одинаковую остаточную активность при расщеплении обоих субстратов.

Влияние сахаров и лактона на расщепление β -D-галактопиранозида и β -D-фукопиранозида суммировано в табл. 1. Наиболее сильное ингибирующее действие на расщепление обоих субстратов оказывали D-галактонолактон и D-фукоза. Оба ингибитора в большей степени подавляли расщепление β -D-галактозида.

Для решения вопроса о взаимоотношении β -D-галактозидазной и β -D-фукозидазной активностей мы использовали метод смешанных суб-

стратов (¹⁰). На рис. 4 показана зависимость расщепления β -D-галактозида, β -D-фукозида и смеси обоих субстратов от времени инкубации. Прерывистая линия показывает теоретическую скорость реакции расщепления смеси субстратов в случае аддитивности. Как видно, при использовании смешанных субстратов аддитивность скоростей не наблюдалась.

Таким образом, получен ряд доказательств в пользу того, что β -D-фукозидазная активность связана с четвертой формой β -D-галактозидазы.

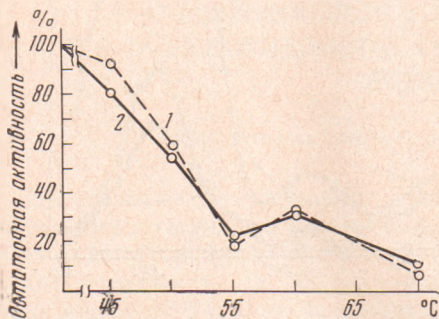


Рис. 3

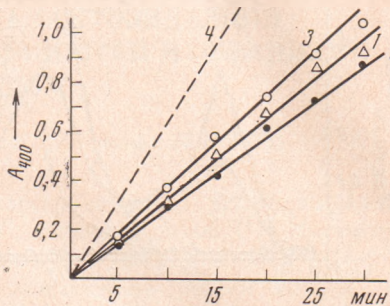


Рис. 4

Рис. 3. Влияние температурной обработки на β -D-галактозидазную (1) и β -D-фукозидазную (2) активности. Пробы прогревали при соответствующей температуре в течение 10 мин. После охлаждения проб на льду отбирали по 0,05 мл из каждой пробы и определяли остаточную активность обычным методом. В качестве контролей служили непрогретые образцы

Рис. 4. Скорость расщепления β -D-галактозида (1), β -D-фукозида (2) и смеси обоих субстратов (3). 4 — теоретическая скорость расщепления смеси обоих субстратов при аддитивности. Конечная концентрация каждого субстрата 0,4 мМ

Как было показано, при гельфильтрации на колонках с сефадексом Г-200 характер элюиционных профилей β -D-фукозидазной и β -D-галактозидазной активностей был идентичен. Было обнаружено также большое сходство в свойствах ферментного препарата при сравнительном изучении расщепления β -D-галактозида и β -D-фукозида. Обе активности имели одинаковый

Таблица 1

Влияние сахаров и галактонолактона на расщепление β -D-галактозида и β -D-фукозида (угнетение, %)

Субстраты	D-галактоза, мМ			D-фукоза, мМ			D-(1-4)-галактонолактон, мМ		
	20	40	100	20	40	100	20	40	100
<i>n</i> -Нитрофенил- β -D-галактопиранозид	7,5	11	21,5	24,5	38	65	64	75	78
<i>n</i> -Нитрофенил- β -D-фукопиранозид	6,5	8,25	—	8,25	14,8	31	29,5	34,5	42

Примечание. Инкубационная проба (0,25 мл) содержала: 75,5 и 34 ед. галактозидазы и фукозидазы соответственно; время инкубации при определении обеих активностей 15 мин. За 100% принята активность без ингибиторов. Конечная концентрация субстратов 1 мМ.

оптимум pH, одинаковую pH-стабильность и в равной степени изменяли активность при температурной обработке. Данные, полученные при использовании ингибиторов и кинетического метода смешанных субстратов, также свидетельствуют о том, что расщепление β -D-галактозида и β -D-фукозида осуществляется одним ферментом. Это может иметь определенное практическое значение при оценке различных форм β -галактозидазы. Если предварительно установлено, какая из форм галактозидазы расщепляет

β -D-фукозид, то последний может применяться для количественной оценки данной формы β -D-галактозидазы без ее выделения.

Недавно появилась работа, в которой изучались гликозидазные активности в лейкоцитах человека при GM₁-ганглиозидозе (¹¹). Авторы сообщают, что при этом наследственном заболевании на фоне повышенной активности ряда гликозидаз у больных резко снижалась не только общая β -D-галактозидазная, но и β -D-фукозидазная активность. Этот факт согласуется с нашим выводом о том, что в организме животных и, вероятно, человека β -D-фукозидазная активность обусловлена β -D-галактозидазой или одной из ее форм.

Автор выражает признательность проф. Е. Л. Розенфельд за интерес к работе и А. А. Прокопенкову за помощь в постановке экспериментов.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
22 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Я. Видершайн, Вopr. мед. хим., **14**, 115 (1968). ² G. A. Levvy, Nature, **187**, 1027 (1960). ³ G. A. Levvy, A. McAllan, Biochem. J., **87**, 361 (1963). ⁴ J. R. Esterly, A. C. Standen, B. Pearson, J. Histochem. Cytochem., **15**, 470 (1967). ⁵ Z. Lojda, J. Kraml, Histochemie, **25**, 195 (1971). ⁶ K. Wallenfels, J. Fischer, Hoppe—Seyler's, Zs., **321**, 223 (1960). ⁷ Г. Я. Видершайн, ДАН, **204**, 727 (1972). ⁸ И. С. Лукомская, В. К. Городецкий, Биохимия, **26**, 477 (1961). ⁹ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ¹⁰ M. Dixon, E. C. Webb, Enzymes, Ed. 2, N. Y., 1964, p. 84. ¹¹ J. Hindman, E. Cotlier, Clin. Chem., **18**, 971 (1972).