



УДК 577.155.02

**β-ЦИАНОАЛАНИНСИНТАЗА: СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ,  
ОТНОШЕНИЕ К ИНГИБИТОРАМ***Акопян Т. Н., Толоса Э. А., Горяченкови Е. В.,  
Браунштейн А. Е.**Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР, Москва*

Пиридоксаль-Р-зависимый фермент β-цианоаланинсинтаза катализирует синтез β-цианоаланина из L-цистеина и цианида. Показано, что гомогенные препараты этого фермента из митохондрий проростков синего люпина используют в качестве первичных субстратов, помимо L-цистеина, β-хлораланин и L-цистин. L-серин, O-ацетилсерин и тиоэфир цистеина не могут служить субстратами. Установлено, что в процессе превращения L-цистина в результате его неферментативного цианолиза образуется β-тиоцианоаланин, который и является первичным субстратом фермента. В реакциях с L-цистеином или β-хлораланином наряду с цианидом в качестве косубстратов используются алифатические тиолы: β-меркаптоэтанол, метил- и этилмеркаптан, цистеамин, но не L-гомоцистин. β-Цианоаланинсинтаза не ингибируется высокими концентрациями D,L-циклосерина<sub>1</sub> и D,L-пенициллинамина.

В превращениях серосодержащих и оксиаминокислот у микроорганизмов, растений и животных существенную роль играют широко распространенные пиридоксаль-Р-зависимые лиазы, избирательно катализирующие реакции элиминирования или замещения электроотрицательных групп при β- или γ-углеродных атомах замещенных аминокислот.

Нами проводятся сравнительные исследования некоторых пиридоксаль-Р-зависимых лиаз, катализирующих превращения L-цистеина, L-серина и их аналогов только по типу реакций β-замещения. К ним относятся: цистеинлиаза желточного мешка куриных эмбрионов (КФ 4.4.1.10), серинсульфгидраза печени кур (КФ 4.1.1.8) и функционально идентичная ей цистатионинсинтаза печени крыс (КФ 4.1.1.8) [1—3]. Как установлено, все исследуемые лиазы используют алифатические тиолы (RSH) как замещающие агенты (косубстраты). По механизму действия эти ферменты отличаются от пиридоксаль-Р-содержащих лиаз, осуществляющих реакции α,β-элиминирования β-замещенных аминокислот [1, 2].

Для выявления общих закономерностей механизма действия β-замещающих пиридоксаль-Р-зависимых лиаз представляло интерес исследовать некоторые каталитические свойства еще одного фермента этой группы — β-цианоаланинсинтазы (КФ 4.1.1.9), отличающейся от исследованных ранее лиаз по косубстратной специфичности.

β-Цианоаланинсинтаза найдена рядом авторов [4—6] у разных бобовых, злаковых и других растений как начальный фермент на одном из путей биосинтеза аспарагина (через β-цианоаланин в качестве промежуточного продукта). Гендриксон и Кон [7] получили очищенные препараты β-цианоаланинсинтазы из ацетонированного порошка митохондрий си-

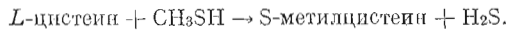
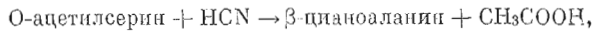
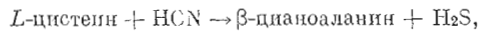
Скорость образования продуктов (мкмоль/мин·мг) из разных аминокислот под действием β-цианоаланинсинтазы

Субстраты (2,5 мМ)	β-Циано-аланин*	S-окси-этилцистеин**	Субстраты (2,5 мМ)	β-Циано-аланин	S-окси-этилцистеин
L-цистеин	32,6	30,3	β-Меркаптоэтанол	0	—
β-Cl-L-аланин	26,6	27,1	L-серин, L-серин-О-фосфат, S-оксиэтилцистеин, β-циано-L-аланин	0	—
L-цистин	2,6	—			
β-Циано-L-аланин	0	0			

\*Косубстрат 2,5 мМ K<sup>14</sup> CN.

\*\* Косубстрат 25 мМ β-меркаптоэтанол.

него люпина (со 140-кратной степенью очистки). Они показали, что фермент является протеидом пиридоксаль-Р и катализирует следующие реакции:



При использовании нового метода очистки нами получены препараты β-цианоаланинсинтазы (с 200-кратной степенью очистки), гомогенные при электрофорезе в полиакриламидном геле (см. «Экспериментальную часть»). Целью данной работы является изучение субстратной и косубстратной специфичности этого фермента, а также его отношения к ингибиторам.

В табл. 1 приведены первичные скорости образования β-цианоаланина и S-оксиэтилцистеина из различных аминокислот в присутствии цианида и β-меркаптоэтанола в реакциях, катализируемых β-цианоаланинсинтазой. Как видно, в реакциях образования β-цианоаланина активным субстратом фермента, наряду с L-цистеином, является β-хлор-L-аланин. В то же время в условиях опыта при pH 8,8 O-ацетил-L-серин не является субстратом для фермента. Исследование реакции показало, что причиной этого является перегруппировка O-ацетилсерина в N-ацетилсерин, который, как известно, не является субстратом β-цианоаланинсинтазы [7]. Однако, как следует из наших экспериментов, при менее щелочном значении буфера (pH 7,5), не оптимальном для фермента, и при более высокой концентрации субстрата (10<sup>-2</sup> M) O-ацетилсерин медленно реагирует с [<sup>14</sup>C]цианидом, образуя следы β-цианоаланина. В опытах с [<sup>14</sup>C]цианидом показано, что L-серин и L-аланин, O-фосфосерин, S-оксиэтил-L-цистеин и β-цианоаланин не являются субстратами для β-цианоаланинсинтазы.

При исследовании различных соединений как возможных субстратов фермента мы обратили внимание на L-цистин в реакции с цианидом. Скорость этой реакции составляет лишь 8% от скорости реакции с L-цистеином (табл. 1). При этом количество образующегося β-[<sup>14</sup>C]цианоаланина значительно выше одного эквивалента по отношению к образованию H<sub>2</sub>S. По аналогии с данными Ресслера и соавт. [8] о пиридоксаль-Р-содержащем ферменте из *Chromobacterium violaceum*, который катализирует образование γ-циано-α-аминомасляной кислоты и тиоцианата из L-гомоцистина и цианида, мы предположили, что имеем дело с неферментативным взаимодействием L-цистина с цианидом, приводящим к образованию L-цистеина и β-роданоаланина. Неферментативное взаимодействие L-цистина с цианидом при щелочных значениях pH исследовано рядом авторов [9]; показано, что при этом происходит цианолиз дисульфидной

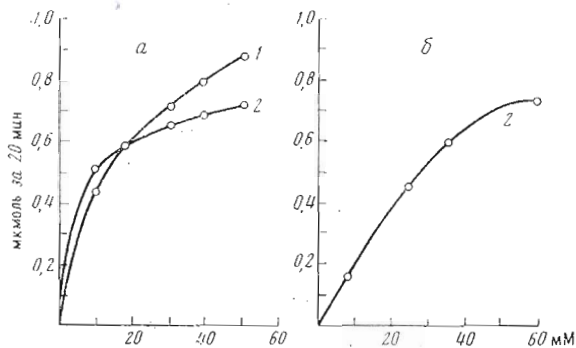


Рис. 1

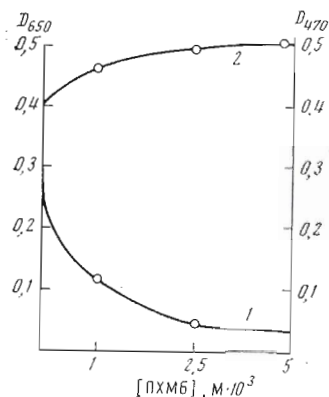
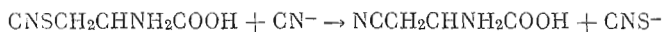


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость образования  $H_2S$  (1) и роданида (2) от количества  $L$ -цистина,  $[KCN]$  — 50 мМ (а) и от количества  $KCN$ ,  $[цистин]$  — 20 мМ (б)

Рис. 2. Влияние ПХМБ на образование  $H_2S$  (1) и роданида (2) из  $L$ -цистина и  $KCN$  в реакции, катализируемой  $\beta$ -цианоаланинсинтазой

связи с образованием  $L$ -цистеина и  $\beta$ -роданоаланина. Возникло предположение, что при взаимодействии  $L$ -цистина с цианидом в присутствии цианоаланинсинтазы образующийся роданоаланин может быть использован как первичный субстрат в реакции  $\beta$ -замещения, катализируемой ферментом:



Таким образом, при действии фермента на систему  $L$ -цистин — цианид продуктами реакции должны быть  $\beta$ -цианоаланин,  $H_2S$  и  $CNS^-$ . Действительно, в опытных пробах после инкубации  $\beta$ -циано-аланинсинтазы с  $L$ -цистином и цианидом было обнаружено наличие роданида (см. рис. 1). Найдено, что в реакции образования роданоаланина оптимальные концентрации субстратов —  $L$ -цистина и цианида — составляют 20 и 50 мМ соответственно. Предполагаемый механизм реакции с промежуточным образованием роданоаланина подтверждают результаты опытов, в которых в реакционную смесь помимо фермента и субстратов ( $L$ -цистина и  $KCN$ ) добавляли йодацетат или  $n$ -хлормеркурибензоат (ПХМБ). В этих условиях цистеин, образующийся в реакции цианолиза  $L$ -цистина, связывается и не может быть использован в ферментативной реакции  $\beta$ -замещения.

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, присутствие ПХМБ практически не влияет на образование роданид-иона из  $L$ -цистина и цианида, однако образование  $H_2S$  при этом значительно снижается.

Для независимого подтверждения возможности использования  $\beta$ -родано- $L$ -аланина как первичного субстрата было применено его относительно стойкое  $N$ -ацетилпроизводное.

Попытки синтезировать незамещенный  $\beta$ -роданоаланин по методу Ресслера и соавт. [8], описанному для синтеза  $\gamma$ -родано- $\alpha$ -аминомасляной кислоты, не увенчались успехом, поскольку это соединение быстро превращалось в циклический продукт 2-иминотиазолин-4-карбоновую кислоту:

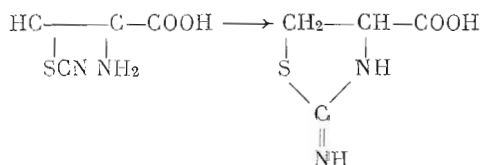


Таблица 2

Образование роданид-иона в реакциях  $\beta$ -родано-N-ацетил-аланина с цианидом, катализируемых  $\beta$ -цианоаланин-синтазой и ацилазой I

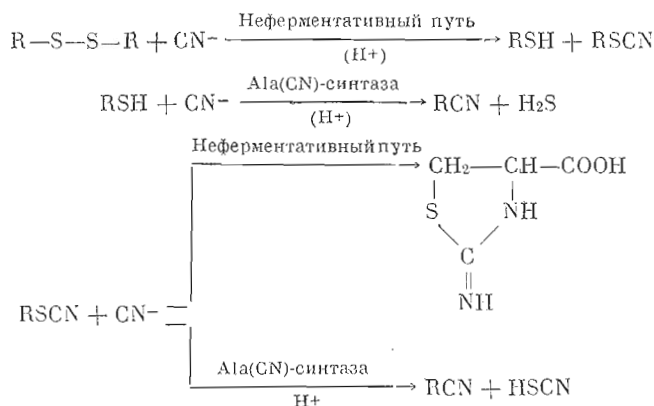
Пробы	$\beta$ -Цианоаланин-синтаза	Ацилаза I	$D_{470}$
I	+	-	0,060
II	-	+	0,040
III	+	+	0,250

Пробы объемом 2 мл содержали: N-ацетил- $\beta$ -роданоаланин—20 мкмоль, KCN—50 мкмоль, трис-HCl буфер (pH 8,0)—200 мкмоль, 120 милледианец  $\beta$ -цианоаланинсинтазы, 0,2 мл суспензии аминоклазы I. Инкубация 1 ч при 30°.  $D_{470}$  нм — поглощение после добавления  $FeCl_3$ .

Защитную N-ацетильную группу CN-ацетилпроизводного  $\beta$ -родано-*L*-аланина снимали непосредственно в инкубационных пробах путем ферментативного гидролиза при помощи препарата N-ацилазы I, добавленного в пробы после внесения в них субстратов (N-ацетил- $\beta$ -роданоаланин + KCN) и  $\beta$ -цианоаланинсинтазы.

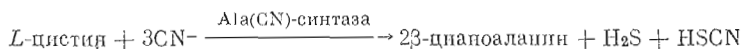
Как видно из данных, приведенных в табл. 2, образование роданида, наблюдаемое в полной опытной смеси в присутствии ацилазы I, возрастает более чем в 4 раза. Эти данные убедительно подтверждают, что  $\beta$ -роданоаланин используется цианоаланинсинтазой как аминокислота — субстрат. Последний в отсутствие фермента быстро циклизуется; при действии же  $\beta$ -цианоаланинсинтазы из  $\beta$ -роданоаланина в реакции с цианидом образуются  $\beta$ -цианоаланин и тиоцианат.

Ниже приведена схема превращений *L*-цистина в присутствии цианида и цианоаланинсинтазы.



где  $R-CH_2CH(NH_2)COO^-$ .

Суммарная реакция:



При изучении специфичности  $\beta$ -цианоаланинсинтазы по отношению к косубстрату найдено, что фермент наряду с цианидом ( $K_m$  0,55 мМ) использует  $\beta$ -меркаптоэтанол ( $K_m$  20 мМ). Образующийся продукт *S*-оксипропил-*L*-цистеин был идентифицирован в реакциях как с *L*-цистеином, так и  $\beta$ -хлораланином (табл. 1). Косубстратами фермента могут служить

Таблица 3

Косубстратная специфичность  $\beta$ -цианоаланинсинтазы в реакции с цистеином

Косубстраты	Относительная скорость реакции *, %	Косубстраты	Относительная скорость реакции *, %
KCN	100	$\beta$ -Меркаптоэтанол	83
Метилмеркаптан **	>100	Цистеамин	23
Этилмеркаптан	45	<i>L</i> -Гомоцистеин, глутатион,	0
<i>n</i> -Бутилмеркаптан	6	дитиотреит, сульфит,	
<i>tert</i> -Бутил- и бензилмеркаптаны, тиогликолевая и 3-меркаптопропионовая кислоты	0	KSCN	

\* За 100% принимали скорость реакции в системе с KCN в качестве косубстрата

\*\* Результат не точен ввиду высокой летучести соединения.

Пробы содержали: первичный субстрат *L*-цистеин — 5 мкмоль;  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{CNS}^-$ , гомоцистеин, дитиотреит — 5 мкмоль; остальные косубстраты — 50 мкмоль; трис-HCl буфер (pH 8,8) — 200 мкмоль, фермента — 35 миллиединиц. Инкубация 10 мин при 30°.

Таблица 4

Действие некоторых ингибиторов на активность  $\beta$ -цианоаланинсинтазы (торможение в процентах)

Ингибиторы	Концентрация, М				Ингибиторы	Концентрация, М			
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Гидроксиламин	50	35	5	—	ПХМБ *	95	10	—	—
NaBH <sub>4</sub>	—	—	100	90	Йодуксусная кислота *	85	5	—	—
Аминооксиуксусная кислота	100	93	74	30	<i>DL</i> -циклосерин	0	—	—	—
Аминооксипропионовая кислота	100	72	37	10	<i>DL</i> -пеницилламин	0	—	—	—

\* В этих пробах активность фермента определяли в системе с  $\beta$ -Cl-*L*-аланином + KCN. Фермент предварительно инкубировали с ингибитором в течение 5 мин при комнатной температуре.

также другие меркаптосоединения — метил- и этилмеркаптаны, цистеамин (табл. 3). Однако фермент не использует в качестве косубстратов бутил- и бензилмеркаптан, гомоцистеин, тиогликолевую и 3-меркаптопропионовую кислоты, дитиотреит, а также тиоцианат- и сульфит-ионы.

Данные, характеризующие механизм действия цианоаланинсинтазы, получены также при исследовании отношения фермента к ингибиторам. Найдено, что наиболее сильными ингибиторами фермента являются субстратоподобные карбонильные реагенты, блокирующие формильную группу пиридоксаль-Р — аминооксиуксусная и 3-аминооксипропионовая кислоты (табл. 4). Как наблюдали Гендриксон с соавт. [7], ПХМБ, йодуксусная кислота и ее амид в реакции с *L*-цистеином и цианидом снижают активность  $\beta$ -цианоаланинсинтазы в концентрациях 10<sup>-3</sup> М и 10<sup>-2</sup> М соответственно на 30 и 100%. Эти авторы не учитывали, что в таких концентрациях названные соединения реагируют в первую очередь не с HS-группами фермента, а с субстратом *L*-цистеином. В наших исследованиях по ингибированию фермента реактивами на HS-группы при использовании в качестве субстратов  $\beta$ -хлор-*L*-аланина и цианида показано, что цианоаланинсинтаза проявляет низкую чувствительность к действию этих реагентов.

$\beta$ -Цианоаланинсинтаза, подобно другим пиридоксаль-Р-содержащим ферментам, легко инактивируется боргидридом натрия, который, как известно, восстанавливает альдиминную связь между альдегидной группой пиридоксаль-Р и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина белка.

Особый интерес представляют данные о полной нечувствительности фермента к торможению высокими концентрациями *DL*-циклосерина и *DL*-пеницилلامина. Известно, что к инаktivированию *DL*-циклосерином и его производным высоко чувствительны пиридоксальные ферменты, механизм действия которых заведомо включает образование пиридоксамин-Р-кетимина как необходимых промежуточных соединений; эти ингибиторы не оказывают влияния на активность ферментов, при действии которых на субстраты не образуются кетимины, например  $\alpha$ -декарбоксилаз [2]. Установлено, что характерной особенностью  $\beta$ -замещающих лиаз (серинсульфгидразы, цистатионин- $\beta$ -синтазы и цистеинлиазы) является полная резистентность к циклосерину [3].  $\beta$ -Цианоаланинсинтаза, следовательно, проявляет по своему отношению к этому ингибитору свойства, характерные для других ферментов, относящихся к подгруппе  $\beta$ -замещающих лиаз. Согласно Браунштейну [2], нечувствительность пиридоксаль-Р-зависимого фермента к ингибиторам аминоксозолидонового ряда может служить критерием отсутствия пиридоксамин-Р-кетимина как обязательного звена в механизме ферментатической реакции.

Известно, что субстратоподобные 1-амино-2-тиолы, в частности *DL*-пеницилламиды, действуют как конкурентные ингибиторы некоторых пиридоксаль-Р-содержащих ферментов (в том числе лиаз, катализирующих реакции  $\alpha$ ,  $\beta$ - и  $\beta$ ,  $\gamma$ -элиминирования), образуя с коферментом устойчивые тиазolidиновые производные; их комплексы с ферментами легко диссоциируют с образованием соответствующих апоферментов. При исследовании  $\beta$ -замещающих лиаз было найдено [2, 3], что активность их не нарушается  $\beta$ -меркаптоаминокислотами. Результаты, приведенные в данной работе, показали, что  $\beta$ -цианоаланинсинтаза также нечувствительна к *DL*-пеницилламину, т. е. проявляет в этом отношении свойства, характерные для ферментов, катализирующих реакции по типу  $\beta$ -замещения. Наблюдаемые различия между пиридоксаль-Р-зависимыми ферментами по отношению к ингибированию аминотиолами, по-видимому, связаны с различиями в пространственной конформации фермент-субстратных комплексов в активных центрах лиаз, катализирующих реакции  $\beta$ -замещения, с одной стороны,  $\alpha$ ,  $\beta$ - и  $\beta$ ,  $\gamma$ -элиминирования — с другой [1].

### Экспериментальная часть

В работе использовали пиридоксаль-5-фосфат фирмы «Reanal» (ВНР), препарат  $\beta$ -цианоаланин фирмы «Calbiochem» (США). S-циано-N-ацетил-L-цистеин синтезировали из N-ацетил-L-цистеина и бромциана по методу Олдриджа [10].

Согласно данным работы [11], S-циано-N-ацетилцистеин нестабилен и поэтому его нельзя получить из раствора в кристаллической форме. Присутствие этого соединения на конечной стадии синтеза устанавливали по наличию в ИК-спектре полосы при 2140 см<sup>-1</sup>, характерной для SCN-группы, а также по отсутствию окраски в реакциях с нингидрином и нитропруссидом. N-ацетил-цистеин получали из L-цистеина по методу Пери [12].

Препарат  $\beta$ -хлораланина синтезировали из L-серина \* [13] с выходом 70% на конечной стадии. Полученное соединение хроматографически чистое; по спектру ЯМР (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) оно имеет следующие параметры:  $\delta_{\text{CH}}$  4,13;  $\delta_{\text{CH}_2}$  4,01 м. д.;  $J$  3,9 Гц.

\* За ценные советы по синтезу  $\beta$ -хлораланина и его идентификации приносим благодарность Р. М. Хомутову и В. Л. Флорентьеву.

Высокоочищенные препараты  $\beta$ -цианоаланинсинтазы получали из проростков синего люпина по разработанному нами методу [14]. В исследованиях применяли препараты фермента с удельной активностью 40—45 мкмоль  $\cdot$  мин<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup>.

Использованные в работе частично очищенные препараты аминокислоты I из почки свиньи, полученные по методу [15], и необходимый для определения активности ацилазы препарат N-ацетилметионин были любезно предоставлены нам Г. А. Равдель (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР), за что приносим ей искреннюю благодарность.

Для хроматографии и электрофореза использовали бумагу FN4 и FN16 («Filtgas», ГДР). Разделение на хроматограммах проводили в смеси бутанол — муравьиная кислота — вода (15 : 3 : 2). Аминокислоты на хроматограммах идентифицировали путем окрашивания их 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне с последующим количественным определением в виде медно-нингидриновых комплексов [16].

*Определение активности фермента.* Активность  $\beta$ -цианоаланинсинтазы определяли путем измерения скорости образования конечных продуктов реакции —  $H_2S$ , цианоаланина, тиоцианата. За единицу активности принимали то количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин в условиях определения активности фермента. Удельную активность выражали в единицах активности на 1 мг белка.

*Образующийся из L-цистеина  $H_2S$*  определяли спектрофотометрически двумя методами.

1) По образованию метиленового синего [17]. Пробы объемом 2 мл, содержащие 5 мкмоль L-цистеина, 5 мкмоль KCN, 200 мкмоль трис-HCl буфера (pH 8,8) и 10—40 миллиединиц фермента, инкубировали при 30° в течение 10 мин. Затем в пробы добавляли 0,5 мл 0,02 M солянокислого N, N-диметил-n-фенилендиамина в 7,2 M HCl и 0,5 мл 0,03 M  $FeCl_3$  в 1,2 M HCl и через 20 мин определяли образовавшийся метиленовый синий по поглощению при 650 нм. В этих условиях  $D_{650\text{ нм}}$ , равное 1, соответствует наличию в пробе 0,65 мкмоль  $H_2S$ .

2) По образованию коллоидных растворов  $PbS$  [3]. Пробы объемом 2 мл содержали 5 мкмоль L-цистеина, 50 мкмоль косубстрата (меркаптосоединения), 0,4 мкмоль  $Pb(CH_3COO)_2$ , 200 мкмоль трис-HCl буфера (pH 8,8) и 3—10 миллиединиц фермента. Инкубацию проводили при 30° в течение 10 мин с последующим измерением поглощения при 360 нм. В условиях опыта наличие 0,36 мкмоль  $H_2S$  давало  $D_{360\text{ нм}} = 1,0$ .

*Измерение активности фермента по образованию  $\beta$ -цианоаланина.* В этом случае в качестве косубстрата использовали [<sup>14</sup>C]-KCN (мКи/мкмоль). Пробы объемом 0,5 мл, содержащие субстраты (по 1,25 мкмоль), 50 мкмоль трис-HCl буфера (pH 8,8) и 20—30 миллиединиц фермента, инкубировали при 30° в течение 10—20 мин. Реакцию останавливали подкислением при помощи  $CH_3COOH$  до pH 5,0. Одну десятую часть каждой пробы наносили на полосы бумаги и проводили высоковольтный электрофорез при 4000 В в течение 40 мин в буфере уксусная кислота — муравьиная кислота — вода (15 : 3 : 2). Радиоактивность [<sup>14</sup>C]- $\beta$ -цианоаланина в элюатах измеряли при помощи автоматического счетчика «SL-40», используя сцинтиллятор, состоящий из 1000 мл диоксана, 100 г нафталина, 4 г PPO (2,5-дифенилоксазол) и 0,2 г PPOP (1,4-бис-2-(5-фенилоксазолил)-бензол. Эффективность счета составляла 80%.

*Тиоцианат* определяли методом Сорбо [18] по интенсивности окраски, образуемой в присутствии  $FeCl_3$ . Пробы объемом 2 мл содержали 40 мкмоль L-цистеина, 100 мкмоль KCN, 200 мкмоль трис-HCl буфера (pH 8,8) и 20—60 миллиединиц фермента. Инкубацию проводили при 30° в течение 20 мин. Затем добавляли 0,3 мл 1 н. HCl, 0,5 мл 5 н.  $HNO_3$  и 0,5 мл 0,3 M  $FeCl_3$  и через 5 мин измеряли поглощение при 470 нм. В этих условиях  $D_{470\text{ нм}}$ , равное 1,0, соответствовало наличию 0,85 мкмоль тиоцианата в пробе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. (1972) in FEBS Symposium, vol. 29 (8 FEBS Meeting, Amsterdam), New Holland, 135—150.
2. Браунштейн А. Е. (1974) Изв. АН СССР. Сер. биол., 5, 629—642.
3. Braunstein A. E., Goryachenkova E. V., Tolosa E. A., Willhardt I. H., Yefremova L. L. (1971) Biochim. et biophys. acta, 242, 247—260.
4. Blumenthal S. C., Hendrickson H. R., Abrol I. P., Conn E. E. (1968) J. Biol. Chem. 243, 5302—5307.
5. Floss H. G., Hadwiger L., Conn E. E. (1965) Nature, 208, 1207—1208.
6. Dunnill P. M., Fowden L. (1965) Nature, 208, 1206—1207.
7. Hendrickson H. R., Conn E. E. (1968) J. Biol. Chem., 244, 2632—2640.
8. Ressler G., Abe O., Kondo J., Cottrelli B., Abe K. (1973) Biochemistry, 12, 5369—5377.
9. Gawron O., Fernand J. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 2906—2908.
10. Aldridge W. N. (1951) Biochem J., 48, 271—277.
11. Castimpoos N., Wood J. (1964) J. Biol. Chem., 239, 4132—4137.
12. Pirie N. W. (1931) Biochem. J., 25, 614—615.
13. Greenstein D., Winitz M. (1961) in Chemistry of aminoacids, 2677—2678.
14. Akopyan T. N., Goryachenkova E. V. (1974) Abstracts of US-USSR. Symposium on Biological Pyridoxal Catalysis, Leningrad, 9.
15. Birnbaum S. M., Levintow L., Kingsbey R. B., Greenstein J. (1952) J. Biol. Chem., 194, 455—470.
16. Bode F. (1955) Biochem. Z., 326, 433—437.
17. Siegel L. M. (1965) Analyt. Biochem., 11, 125—131.
18. Sorbö B. H. (1955) Methods in Enzymology, 2, 334—335.

Поступила в редакцию  
28.III.1975

### β-CYANOALANINE SYNTHASE: SUBSTRATE SPECIFICITY AND SENSITIVITY TO INHIBITORS

AKOPYAN T. N., TOLOSA E. A., GORYACHENKOVA E. V.,  
BRAUNSTEIN A. E.

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

β-Cyanoalanine synthase is a pyridoxal-P dependent enzyme which catalyses the formation of β-cyanoalanine from *L*-cysteine and cyanide. It was shown that β-cyanoalanine synthase uses as primary substrates, in addition to *L*-cysteine, β-chloroalanine and to a lesser extent *L*-cystine. It is demonstrated that β-thiocyanoalanine formed from *L*-cystine during nonenzymic cyanolysis is a primary substrate for this enzyme. In reactions with *L*-cysteine and β-chloroalanine the enzyme can use as co-substrates, in addition to cyanide, aliphatic thiols such as β-mercaptoethanol, methyl- and ethylmercaptan and cysteamine. β-Cyanoalanine synthase is not sensitive to the high concentrations of *DL*-cycloserine and *DL*-penicillamine.