



УДК 577.154.3

НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ СЛАДКОГО
МИНДАЛЯ β -D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛИЗОТИОЦИАНАТОМ

*Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Лажтина О. Е.,
Шульман М. Л.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР*

Показано, что β -D-глюкопиранозилизотиоцианат (I), синтезированный действием тиофосгена на β -D-глюкопиранозиламин, необратимо ингибирует β -глюкозидазу сладкого миндаля. Кривая зависимости скорости инактивации от pH имеет максимум при pH 5,4 и точку перегиба при pH 5,7.

Известно ограниченное число необратимых ингибиторов гликозидаз, пригодных для аффинной метки их активных центров [1-4]. С целью расширения круга ингибиторов такого типа мы исследовали взаимодействие β -глюкозидазы В сладкого миндаля (КФ 3.2.1.21) с β -D-глюкопиранозилизотиоцианатом (I).

Изотиоцианат (I) синтезирован действием тиофосгена на β -D-глюкопиранозиламин (ср. [5]). Хроматографически чистый (I), полученный с выходом 20-25%, представлял собой сироп, неустойчивый при хранении. Его структура подтверждена ИК-спектром, в котором наблюдается полоса при 2100 см^{-1} , характерная для изотиоцианатной группы, а также превращением (I) в его 2,3,4,6-тетра-О-ацетат, идентичный ранее описанному [6].

Изучение взаимодействия β -D-глюкопиранозилизотиоцианата (I) с компонентом В β -глюкозидазы сладкого миндаля показало, что в начальном периоде времени в оптимуме pH действия фермента (pH 6,0) соединение (I) ведет себя как конкурентный ингибитор (см. рис. 1).

Величина константы ингибирования K_i , определенная в реакции ферментативного гидролиза *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида (II), составила 13 мМ. Сопоставление ее с величиной $K_m = 1,9 \text{ мМ}$ для субстрата (II) указывает на меньшее сродство ингибитора I к активному центру, чем у (II).

При длительной инкубации изотиоцианата (I) с ферментом наблюдается необратимое ингибирование последнего. Зависимость инактивации фермента от времени при различных концентрациях (от 25 до 75 мМ) ингибитора (I) представлена на рис. 2. Определенная из данной зависимости кажущаяся константа скорости необратимой бимолекулярной реакции

$E+I \rightarrow E-I$ * составила $0,083 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

* Ковалентносвязанный комплекс.

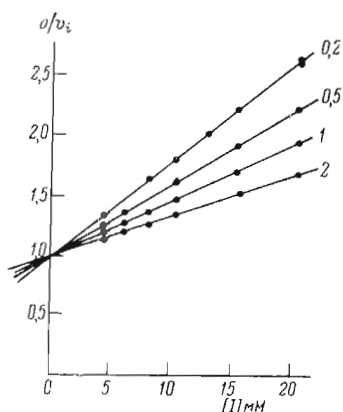


Рис. 1

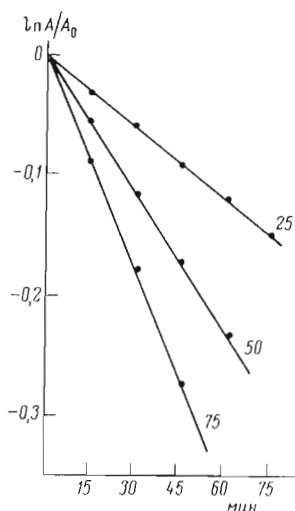


Рис. 2

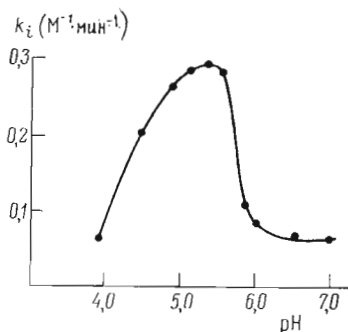


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость v/v_i от концентрации ингибитора (I) [I] при pH 6,0 и концентрациях субстрата (II) 0,2—2,0 мМ

Рис. 2. Необратимое ингибирование β -глюкозидазы В сладкого миндаля β -D-глюкопиранозилизотиоцианатом (I) при pH 6,0 и концентрациях (I) 25—75 мМ

Рис. 3. pH — зависимость инактивации фермента ингибитором (I)

Зависимость k_i от pH (4—7) представлена на рис. 3. Обращает на себя внимание колоколообразный характер этой зависимости с максимумом при pH 5,4 ($k_i=0,30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$). Контрольные опыты показали, что в интервале pH 4,5—6,0 ингибитор (I) достаточно устойчив: его растворы не мутаротируют в условиях инкубации с ферментом, а сам ингибитор (I) может быть выделен в почти неизменном виде (чистота 80—90% по данным ТСХ и ИК-спектров). При pH < 4,5 и $\geq 6,5$ наблюдается распад (I), на что указывают мутаротация растворов и данные ИК-спектров и ТСХ. Резкий спад правой ветви кривой на рис. 3 в пределах стабильности ингибитора (I) указывает, по-видимому, на участие в процессе группировки активного центра с рК 5,7.

Экспериментальная часть

Фермент, компонент В β -глюкозидазы сладкого миндаля, удельной активности 600 ед/мг белка, выделен из коммерческого препарата фирмы «CalBiochem» (USA) по методике работы [7].

Субстрат, *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (II) фирмы «Chemapol» (ЧССР), дважды перекристаллизованный из спирта, имел т. пл. 164—165°, $[\alpha]_D^{20} - 95^\circ$ (С 1, вода) (ср. [8]).

Ингибитор, β -D-глюкопиранозилизотиоцианат (I). К суспензии 1,1 г (11 ммоль) CaCO_3 в растворе 0,5 мл (6,5 ммоль) тиофосгена в 2 мл хлороформа добавляли по каплям при 0° и перемешивании раствор 1 г (5,6 ммоль) β -D-глюкопиранозиламина [9], т. пл. 128—131°, $[\alpha]_D^{20} + 24^\circ$

(C 1; вода) в 3 мл воды. Смесь интенсивно перемешивали 40 мин, отфильтровывали и экстрагировали охлажденным хлороформом (3×3 мл). Водный слой упаривали досуха при 30° и 10 мм рт. ст., остаток хроматографировали на 70 мл SiO₂ (40–100 мкм), элюируя 15%-ным раствором метанола в хлороформе, и выделяли 270 мг (22%) (I) в виде хроматографически однородного сиропа; $[\alpha]_D^{20} + 72^\circ$ (C 1, MeOH, 3 мин) $\rightarrow +50^\circ$ (22 ч), R_f 0,5 (MeOH–CHCl₃, 3 : 7), ИК-спектр (ν , см⁻¹): 2100 (–N=C=S, валентные колебания). Найдено: С 38,25; Н 5,5; N 6,2; S 13,3%. C₇H₁₁NO₅S. Вычислено: С 38,0; Н 5,0; N 6,3; S 14,5%. При хранении (–10°) заметное разложение вещества наступало через 2–3 сут.

Ацетилирование 100 мг (I) 0,5 мл Ac₂O в 1 мл пиридина (4 ч) привело к его тетраацетату, т. пл. 115–116°, $[\alpha]_D^{20} + 4^\circ$ (C 1, CHCl₃), идентичному тетраацетату, полученному встречным синтезом по работе [6].

Взаимодействие ингибитора (I) с ферментом. Во всех опытах использовали цитратно-фосфатный буфер (рН 4–7, $\mu=0,1$) при +37° С. Активность фермента определяли спектрофотометрически при 400 нм по выделившемуся при гидролизе (II) *n*-нитрофенолу.

Конкурентное ингибирование (рН 6,0). Концентрации инкубационных смесей: [E]=15 мкг/мл, [S] от 0,2 до 2,0 мМ, [I] от 4 до 20 мМ (рис. 1). Пробы отбирали в первые 12 мин с интервалом 2 мин. Константу ингибирования определяли по уравнению $K_i = K_m / \operatorname{tg} \alpha (K_m + [S])$, где α – угол наклона экспериментальной кривой на рис. 1; K_m определяли по методу [10].

Необратимое ингибирование. Концентрации инкубационных смесей (рН от 4 до 7): [E]=75 мкг/мл, [I]=50 мМ. Пробы отбирали в течение 1 ч с интервалом 15 мин. Пробу разводили в 20 раз раствором субстрата (II) (конечная концентрация [S]=2 мМ, рН 6,0) и через 10 мин определяли количество выделившегося *n*-нитрофенола. Константу необратимого ингибирования k_i определяли по уравнению $k_i = -\ln A/A_0/t \cdot [I]$, где A/A_0 – относительная активность фермента для времени t .

ЛИТЕРАТУРА

1. Bause E., Legler G. (1974) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 355, 438–442.
2. Eshdat Y., McKelvy J. F., Sharon N. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5892–5898.
3. Naidar F., Bohak Z., Yariv J. (1972) Biochemistry, 11, 3202–3207.
4. Shulman M. L., Shiyon S. D., Khorlin A. Ya. (1974) Carbohydr. Res., 33, 229–235.
5. Taverna R. D., Langdon R. G. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 54, 593–599.
6. Fischer E. (1914) Ber., 47, 1377–1393.
7. Legler G., Hasnain S. N. (1970) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 351, 25–31.
8. Glaser E., Wulwek W. (1924) Biochem. Z., 145, 514–534.
9. Isbell H. S., Frush H. L. (1958) J. Org. Chem., 23, 1309–1319.
10. Linewiver H., Burk D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., 56, 658.

Поступила в редакцию
20.IX.1974

IRREVERSIBLE INHIBITION OF SWEET ALMOND β -GLUCOSIDASE BY β -D-GLUCOPYRANOSYLISOTHIOCYANATE

A. YA. KHORLIN, S. D. SHIYAN, O. E. LAKHTINA, M. L. SHULMAN

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

β -D-Glucopyranosylisothiocyanate synthesized by the action of thiophosgene on β -D-glucopyranosylamine was shown to inhibit irreversibly the sweet almond β -glucosidase. A pH dependence of the inactivation rate has a maximum at pH 5.4 and a point of inflexion at pH 5.7.