



УДК 577.152.419 * 91.03

© 1990 г.

*Н. Г. Фалеев, М. В. Сапорова, В. М. Великов,
И. С. Сахарова*, А. Н. Закомырдина*, Ю. М. Торчинский**

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРИПТОФАНАЗЫ ИЗ *E. COLI* В 50% ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТАНОЛА И ДИМЕТИЛФОРМАМИДА

Институт элементоорганических соединений им. А. И. Несмеянова АН СССР, Москва;

** Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва*

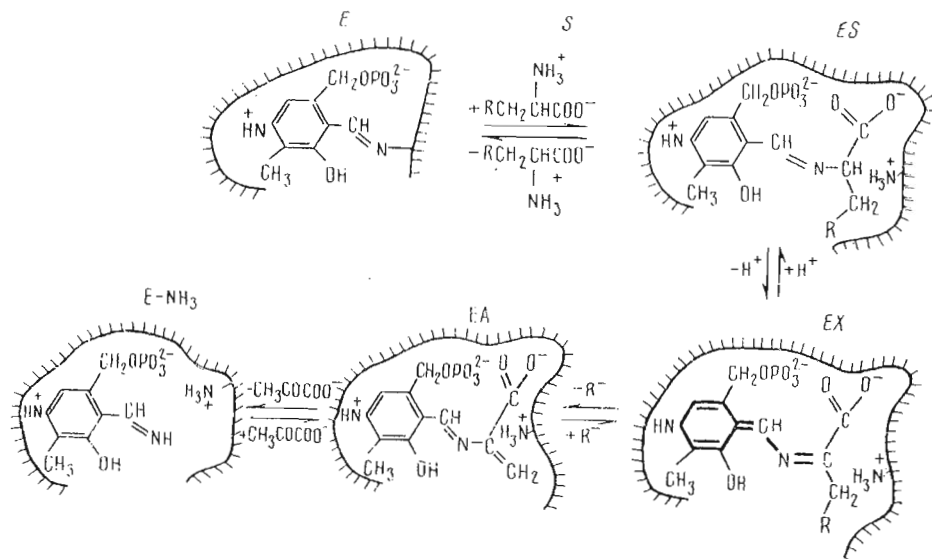
В гомогенных растворах вода — метанол и вода — диметилформамид триптофаназа из клеток *E. coli* сохраняет способность образовывать хиноноидный интермедиат с *L*-аланином вплоть до концентрации органического растворителя 50% по объему. В этих условиях фермент катализирует разложение *S*-*o*-нитрофенил-*L*-цистеина (SOPC) с образованием *o*-нитрофенилтола, пирувата и иона аммония, причем при переходе от воды к водно-органическим растворителям наблюдается возрастание сродства фермента к субстрату и одновременное замедление реакции. В 50% метаноле фермент также катализирует реакцию SOPC с индолем, приводящую к образованию *L*-триптофана, а в смеси ${}^2\text{H}_2\text{O} - \text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ (1 : 1) реализуется ферментативный изотопный обмен α -протона *L*-фенилаланина с полным сохранением конфигурации.

В литературе описаны многочисленные случаи проведения ферментативных реакций в неводных средах [1—3], однако сведения, относящиеся к гомогенным растворам в органических растворителях, более ограничены, а для пиридоксаль-5'-фосфат(пиридоксаль-*P*)-зависимых ферментов и вовсе отсутствуют. В настоящей работе впервые показано, что типичный представитель пиридоксальных ферментов — триптофаназа (триптофан—индол-лиаза, КФ 4.1.99.1) из клеток *E. coli* В/1т7-А сохраняет основные каталитические свойства в смесях вода — метанол и вода — диметилформамид (DMF) в соотношении 1 : 1 по объему.

При взаимодействии триптофаназы с аминокислотными субстратами и некоторыми конкурентными ингибиторами наблюдается образование внешнего альдимида и последующий отрыв α -протона с образованием «хиноноидного интермедиата» (ЕХ, схема) [4, 5]. Обратимость диссоциации α -протона делает возможным изотопный обмен α -протона в ${}^2\text{H}_2\text{O}$ или ${}^3\text{H}_2\text{O}$ для большого числа аминокислот [6], как субстратов триптофаназы, так и ее ингибиторов. При наличии подходящей группы в β -положении субстрата происходит ее отщепление, а образовавшийся аминокриловый интермедиат (ЕА) затем гидролизуетсся с образованием пирувата и иона аммония. Данные Кийка и Филлипса [7], полученные в результате исследования рН-зависимости действия триптофаназы, указывают на то, что в реакции участвует основная группа фермента с pK_a 7,6.

В случае деградации субстрата с плохо уходящей группой (*L*-триптофан), а также при обратной реакции синтеза триптофана из индола, пирувата и аммиака кинетические данные [7] указывают на участие в реакции еще одной основной группы с pK_a 6,0, которая, по-видимому, облегчает таутомеризацию индола.

Цель настоящей работы — установить, в какой мере каталитические свойства триптофаназы сохраняются при переходе от воды к водно-органическим растворителям.



Принципиальная последовательность химических превращений при α,β -элиминировании, катализируемом триптофаназой

Образование хиноноидного интермедиата и изотопный обмен

Для выяснения влияния состава растворителя на образование хиноноидного интермедиата (структура EX на схеме) мы исследовали спектр поглощения комплекса триптофаназы с *L*-аланином в присутствии добавок метанола и DMF. В водном растворе спектр такого комплекса характеризуется полосой поглощения при 504 нм, обусловленной образованием хиноноидного интермедиата [5]. Из рис. 1 видно, что добавление метанола в количестве 1,5% по объему приводит к возрастанию поглощения в указанной области на 40%, а при дальнейшем увеличении содержания метанола вплоть до 50% поглощение несколько уменьшается. При добавлении DMF (рис. 2) в количестве 6% по объему поглощение возрастает на 25%, причем в отличие от предыдущего случая продолжает постепенно увеличиваться вплоть до концентрации DMF 50%. В этих условиях спектры оставались без изменений в течение 3 ч при 25° С. Увеличение содержания органического растворителя до 67% по объему в обоих случаях приводит к денатурации фермента: раствор становится мутным, а после удаления осадка центрифугированием поглощение в области 500 нм больше не наблюдается.

Ферментативный изотопный обмен α -протона в водно-органическом растворителе был изучен в опыте с *L*-фенилаланином. В смеси $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{N} - \text{H}_2\text{O}$ (1 : 1) *L*-фенилаланин подвергался исчерпывающему изотопному обмену. Этот факт подтверждается данными спектра ПМР, где система сигналов АВХ для протонов метиленовой группы и α -протона меняется в результате обмена на АВ-квартет для диастереотопных протонов метиленовой группы. Полученный α -дейтерированный фенилаланин был выделен и подвергнут энантиомерному анализу [8], его оптическая чистота практически не отличалась от оптической чистоты исходного *L*-фенилаланина. Следовательно, в 50% метаноле, как и в воде, ферментативный изотопный обмен α -протона происходит с полным сохранением *L*-конфигурации исходной аминокислоты.

Таким образом, способность фермента образовывать хиноноидный интермедиат с λ_{max} 504 нм и катализировать обмен α -протона в водно-органических растворителях свидетельствует о том, что функциональная группа с pK_a 7,6 (в воде) сохраняет в этих условиях каталитические свойства.

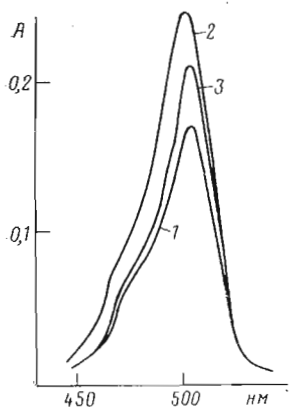


Рис. 1. УФ-спектр комплекса триптофаназы с *L*-аланином в воде (1), в присутствии 1,5 (2) или 50% метанола (3)

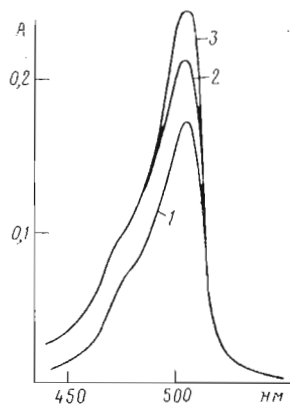
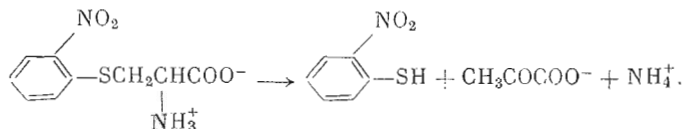


Рис. 2. УФ-спектр комплекса триптофаназы с *L*-аланином в воде (1), в присутствии 6 (2) и 50% DMF (3)

Разложение субстрата, содержащего группу, способную к отщеплению

В водных растворах триптофаназа эффективно катализирует разложение *S*-*o*-нитрофенил-*L*-цистеина (SOPC) согласно следующему уравнению:

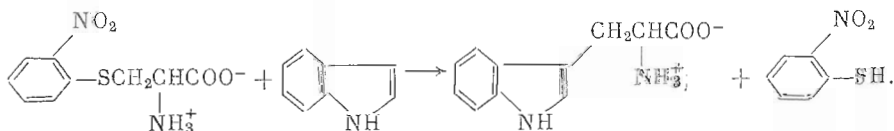


За ходом этой реакции удобно следить по исчезновению продукта, поглощающего при 370 нм.

Как в 50% метаноле, так и в 50% DMF при действии триптофаназы на SOPC наблюдается постепенное уменьшение поглощения при 370 нм и одновременное увеличение поглощения при 410 нм, обусловленного образованием аниона 2-нитрофенилтиола. Ферментативный характер процесса доказывается прямой пропорциональностью между скоростью исчезновения SOPC и концентрацией триптофаназы в растворе (рис. 3). Зависимость скорости от концентрации субстрата в обоих случаях подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен, значения K_m составляют 17 мкМ в 50% метаноле и 50 мкМ в 50% DMF. Соответствующие значения V_{max} составляют 6 и 4,5% от скорости разложения SOPC в водном растворе. Таким образом, следствием перехода от воды к водно-органическому растворителю в обоих случаях является значительное увеличение скорости фермента к субстрату (в воде $K_m = 130$ мкМ) и одновременное замедление реакции.

Процесс с участием индола

Мы установили, что в 50% метаноле триптофаназа катализирует реакцию между SOPC и индолом с образованием *L*-триптофана:



В условиях эксперимента исходный SOPC был израсходован полностью, а выход *L*-триптофана составил 35%. Строение продукта доказано идентичностью его ПМР-спектра спектру триптофана, а также энантиомерным аминокислотным анализом [8].

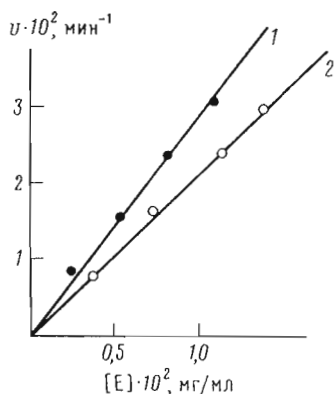


Рис. 3. Зависимость скорости разложения SOPC от содержания триптофаназы при 25° С в 50% метаноле при концентрации SOPC 500 мкМ (1) и в 50% DMF при концентрации SOPC 690 мкМ (2)

Таким образом, в 50% метаноле триптофаназа сохраняет способность образовывать хиноноид, катализировать изотопный обмен α -протона, отщепление «хорошей» уходящей группы, а также синтез *L*-триптофана из индола и SOPC. Следовательно, реализуются основные каталитические свойства, присущие ферменту в водном растворе, включая таутомеризацию индола. Представляют большой интерес причины, обуславливающие изменения кинетических параметров ферментативной реакции в водно-органических растворителях. Можно надеяться, что дальнейшее исследование влияния состава растворителя на различные стадии ферментативного процесса будет способствовать выяснению роли «упорядоченной» структуры воды [9] при формировании активной конформации фермента.

Экспериментальная часть

Получение гомогенных препаратов триптофаназы и определение их активности проводили как описано в работе [5]. SOPC синтезировали по методу Бойланда и др. [10]. Содержание ^2H в использовавшихся $^2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ (отечественного производства) было не менее 99,5%. Спектрофотометрические измерения выполнены на приборе Specord UV-VIS, а спектры ПМР снимали на приборе Bruker WP-200 (200 МГц).

Влияние добавок органических растворителей на спектр комплекса триптофаназы с L-аланином. К 2 мл 0,08 М калий-фосфатного буфера, рН 8,0, содержащего *L*-аланин (140 мМ), пиридоксаль-*P* (80 мкМ) и триптофаназу (0,7 мг/мл), постепенно добавляли метанол или DMF. Измеряли спектры поглощения полученных растворов в интервале 440–550 нм, помещая в кювету сравнения все компоненты, кроме фермента, в тех же концентрациях. Спектры поглощения при различных содержаниях метанола или DMF (в расчете на концентрацию фермента 1 мг/мл) представлены на рис. 1 и 2.

Изотопный обмен α -протона L-фенилаланина в 50% метаноле. К 1,5 мл калий-фосфатного буфера в $^2\text{H}_2\text{O}$ (рD 8,6) [11] добавляли 11 мг *L*-фенилаланина, 1,5 мл $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$, пиридоксаль-*P* в концентрации 80 мкМ и 0,4 мг фермента (в 0,015 мл воды). Смесь инкубировали 72 ч при 30° С, затем добавляли 1 мл 30% трихлоруксусной кислоты, осадок отделяли центрифугированием, аминокислоту выделяли на колонке (12 × 100 мм) с амберлитом CG-120 в H^+ -форме. Продукт высушивали и анализировали методом спектроскопии ПМР (раствор в $^2\text{H}_2\text{O}$) и методом аминокислотного энантиомерного анализа [8]. По данным ПМР, степень изотопного обмена α -протона составляла >95%. Оптическая чистота продукта практически не отличалась от оптической чистоты исходного *L*-фенилаланина (>98%).

Получение L-триптофана в результате ферментативной реакции SOPC с индолом в 50% метаноле. К 3,5 мл 0,08 М калий-фосфатного буфера (рН 8,0) добавляли 3,5 мл метанола, 147 мкмоль SOPC и 290 мкмоль индола, а также пиридоксаль-*P* в концентрации 80 мкМ и 1,5 мг фермента (в 0,05 мл воды). Смесь инкубировали 5 ч при 30° С при перемешивании, затем оставляли на ночь при 20° С без перемешивания, после чего раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл воды и наносили на колонку

(2 × 250 мм) с сефадексом G-10. Элюировали водой, фракции, дающие положительную реакцию с нингидрином, объединяли. УФ-спектр полученного раствора в области 240—350 нм был идентичен спектру триптофана, а общее количество продукта, определенное спектрофотометрически, составляло 51,5 мкмоль (35%). Раствор упаривали досуха, ПМР-спектр полученного продукта в $^2\text{H}_2\text{O}$ был идентичен спектру триптофана. По данным энантиомерного анализа, продукт представляет собой *L*-триптофан, примеси *D*-энантиомера не обнаружено.

Кинетику ферментативного разложения SOPC в 50% метаноле и 50% DMF исследовали спектрофотометрически по уменьшению поглощения субстрата при 370 нм в интервале концентраций SOPC от 700 до 50 мкМ в присутствии пиридоксаль-*P* (80 мкМ) в растворах, полученных смешением равных объемов органических растворителей и 0,08 М калий-фосфатного буфера (рН 8,0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zaks A., Russel A. // J. Biotechnol. 1988. V. 8. № 4. P. 259—270.
2. Deetz J. S., Rozzell J. D. // Trends Biotechnol. 1988. V. 6. № 1. P. 15—19.
3. Klivanov A. M. // Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed). 1989. V. 14. № 4. P. 141—144.
4. Snell E. E. // Adv. Enzymol. 1975. V. 42. P. 287—333.
5. Закомырдина Л. Н., Сахарова И. С., Торчинский Ю. М. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. № 1. С. 187—194.
6. Фалеев Н. Г., Рувинов С. Б., Сапоровская М. Б., Беликов В. М., Закомырдина Л. Н., Сахарова И. С., Торчинский Ю. М. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1989. № 10. С. 2341—2343.
7. Kück D. M., Phillips R. S. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 7339—7344.
8. Сапоровская М. Б., Пасконова Е. А., Никитина С. Б., Беликов В. М., Витт С. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 3. С. 676—688.
9. Маршелл Э. Биофизическая химия. Ч. 2. М.: Мир, 1981. С. 527—528.
10. Boyland E., Manson D., Nery C. // J. Chem. Soc. 1962. № 2. P. 606—612.
11. Faleev N. G., Ruvinov S. B., Demidkina T. V., Myagkikh I. V., Gololobov M. Yu., Bakhmutov V. I., Belikov V. M. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 117. P. 395—401.

Поступила в редакцию
29.IX.1989

N. G. FALIEEV, M. B. SAPOROVSKAYA, V. M. BELIKOV,
I. S. SAKHAROVA*, L. N. ZAKOMIRDINA*, Yu. M. TORCHINSKY*

CATALYTIC PROPERTIES OF TRYPTOPHANASE FROM *E. COLI* IN 50% AQUEOUS SOLUTIONS OF METHANOL AND DIMETHYLFORMAMIDE

A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences of the
USSR, Moscow;

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow

Tryptophanase from *E. coli* retains its ability to form quinonoid intermediate with *L*-alanine in water — methanol and water — dimethylformamide (1 : 1 v/v) solutions. Under these conditions the enzyme catalyzes decomposition of *S*-*o*-nitrophenyl-*L*-cysteine (SOPC) to *o*-nitrophenylthiol, pyruvate and ammonium ion. The enzyme's affinity for this substrate increases on going from water to water-organic solvents whereas the reaction rate decreases. In 50% methanol tryptophanase catalyzes the formation of *L*-tryptophan from indole and SOPC; in the mixture of $^2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ (1 : 1) the enzymatic isotope exchange of α -proton of *L*-phenylalanine with complete retention of configuration was observed.