



УДК 577.159.02

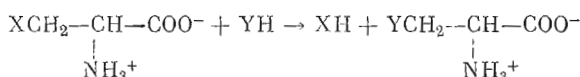
КИНЕТИКА РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ β-ЦИАНОАЛАНИНСИНТАЗОЙ

Толоса Э. А., Козлов Л. В., Рабинков А. Г.,
Горяченкова Е. В.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Исследовали стационарную кинетику реакции десульфирования *L*-цистеина в присутствии KCN, катализируемой β-цианоаланинсинтазой, пиридоксаль-*P*-содержащим ферментом, относящимся к подгруппе β-замещающих лиаз. В работе использовали препараты фермента, полученного из проростков синего люпина с уд. акт. 10–15 мкмоль в 1 мин на 1 мг белка. Исходя из начальных скоростей реакции, были определены V , K_{s1} , K_{s2} и α в условиях постоянной концентрации *L*-цистеина и переменной концентрации KCN и постоянной концентрации KCN и переменной — *L*-цистеина. Из полученных данных следует, что в двухсубстратной реакции, катализируемой β-цианоаланинсинтазой, присоединение субстратов к ферменту взаимозависимо и протекает по неупорядоченному механизму с образованием тройного аминоксубстрат-пиридоксаль-*P*-фермент-косубстратного комплекса с $\alpha > 1$.

β-Цианоаланинсинтаза (КФ 4.4.1.9 — *L*-цистеин — сероводород-лиаза, присоединяющая HCN) — пиридоксаль-*P*-зависимый фермент, катализирует реакции β-замещения полярной группы *L*-цистеина и некоторых β-замещенных производных *L*-аланина, согласно следующему уравнению [1]:



В качестве второго субстрата, или замещающего агента (YH), в этих реакциях фермент использует HCN, а также некоторые меркаптосоединения, например 2-меркаптоэтанол. Продуктами реакции помимо H₂S являются β-цианоаланин или соответственно тиоэфиры цистеина [2, 3].

Установлено, что β-замещающие лиазы по своим каталитическим свойствам — отношению к ингибиторам пиридоксальных ферментов (*D*- и *L*-цикloserину, 2,5- и 3,4-аминотиолам), характеру лабильности α-водорода в субстратных аминокислотах и продуктах реакции и т. д. — значительно отличаются от лиаз, относящихся к подгруппе α, β- или β, γ-элиминирующих [4, 5]. Подобное несоответствие в каталитических свойствах этих лиаз обусловлено различными механизмами их действия, а именно: для β-замещающих лиаз в ходе ферментативного превращения субстратов характерно отсутствие промежуточных кетиминного и α, β-ненасыщенного кофермент-субстратных шиффовых оснований.

При действии β-замещающих лиаз на *L*-цистеин ни при каких экспериментальных условиях не наблюдается образования пирувата и аммиака,

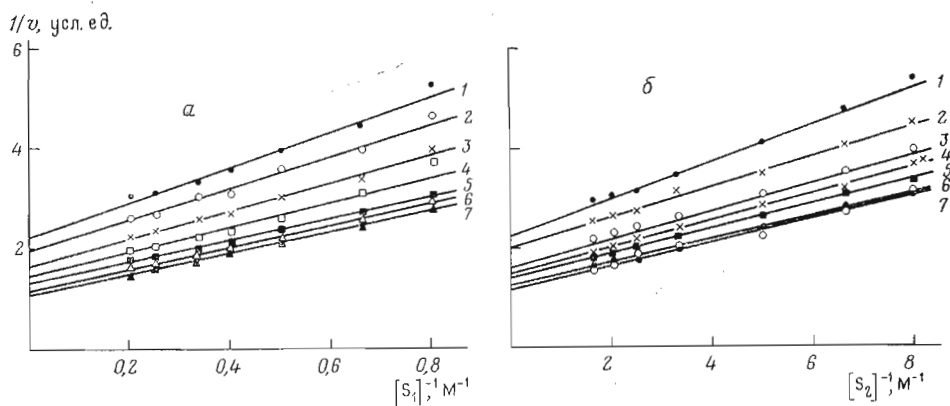


Рис. 1. Графики Лайнуивера — Берка для действия цианоаланинсинтазы в условиях постоянной концентрации KCN $[S_2]$ (1 — 0,125; 2 — 0,15; 3 — 0,2; 4 — 0,3; 5 — 0,4; 6 — 0,5; 7 — 0,6 мМ) и переменной концентрации *L*-цистеина $[S_1]$ (а) и постоянной концентрации *L*-цистеина (1 — 1,25; 2 — 1,5; 3 — 2,0; 4 — 2,5; 5 — 3,0; 6 — 4,0; 7 — 5,0 мМ) и переменной концентрации KCN (б). Координаты точек графиков описываются уравнением $y = ax + b$, где a — тангенс угла наклона, b — отсечение на оси ординат

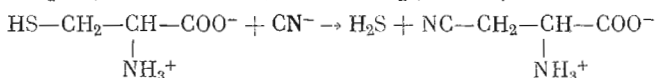
т. е. конечных продуктов реакций α , β -элиминирования. Для лиаз β -замещающего типа установлено, что диссоциация α -водорода в субстратной аминокислоте отсутствует или крайне незначительна в отсутствие второго субстрата (замещающего агента), хотя в образовании «внешнего» пиридоксаль-*P*-альдимида второй субстрат не участвует [6, 7].

Изучение кинетическими методами порядка присоединения субстратов к молекуле фермента и освобождения конечных продуктов дает дополнительную информацию о механизме ферментативной реакции. Клиленд [8, 9] рассматривает следующие возможные последовательности стадий в двухсубстратных ферментативных реакциях:

а) если связывание обоих субстратов реакции предшествует освобождению продуктов — это последовательный механизм (sequential). В случае, когда связывание субстратов и освобождение продуктов подчиняется определенному порядку, механизм называется упорядоченным (ordered). При отсутствии определенного порядка в связывании субстратов и отщеплении продуктов реакции механизм называется неупорядоченным (random);

б) двухсубстратные реакции могут протекать по так называемому пинг-понг- (ping-pong) механизму, при котором после присоединения первого субстрата освобождается первый продукт реакции до присоединения второго субстрата.

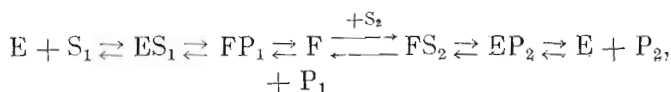
Мы исследовали стационарную кинетику реакции десульфирования *L*-цистеина в присутствии KCN, катализируемой β -цианоаланинсинтазой:



при рН 8,6 и температуре 30°. Были проведены две серии опытов: в одной серии измеряли начальные скорости реакции при нескольких постоянных концентрациях KCN и переменной концентрации *L*-цистеина. Во второй серии опытов варьировали концентрации KCN при неизменных концентрациях *L*-цистеина. Результаты экспериментов представлены на рис. 1 (а и б) в координатах Лайнуивера — Берка.

При рассмотрении характера кривых зависимости начальной скорости реакции от концентраций субстратов графики, на которых отложены зависимости величин $1/v$ от $1/[S]$, на первый взгляд кажутся состоящими из

параллельных прямых в обеих сериях опытов. Это могло бы указывать на протекание реакции по механизму «пинг-понг», характеризующемуся наличием параллельных прямых в координатах Лайнуивера — Берка. «Пинг-понг»-механизм можно представить следующей схемой реакции:



где F — измененная форма фермента.

Начальная скорость реакции равна [7]:

$$v = \frac{V [S_1] [S_2]}{[S_1] [S_2] + K_{s_1} [S_2] + K_{s_2} [S_1]}.$$

В двойных обратных величинах получаем:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_{s_1}}{V} \cdot \frac{1}{[S_1]} + \frac{K_{s_2}}{V} \cdot \frac{1}{[S_2]},$$

т. е. при построении графиков Лайнуивера — Берка должны наблюдаться серии параллельных прямых, поскольку измеряемые величины V и K_m с изменением постоянной концентрации второго субстрата изменяются на одинаковый фактор.

Для постоянной концентрации $[S_2]$:

$$V^{S_2} = V \frac{[S_2]}{K_{s_2} + [S_2]} \quad \text{и} \quad K_m^{S_2} = K_{s_1} \frac{[S_2]}{K_{s_2} + [S_2]},$$

■ для постоянных концентраций $[S_1]$:

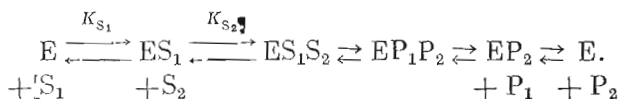
$$V^{S_1} = V \frac{[S_1]}{K_{s_1} + [S_1]} \quad \text{и} \quad K_m^{S_1} = K_{s_2} \frac{[S_1]}{K_{s_1} + [S_1]}.$$

Однако наблюдаемый нами на рис. 1 а, б параллелизм кажущийся; в действительности прямые пересекаются в одной точке, лежащей в третьем квадранте.

Кроме того, чтобы фермент катализировал реакцию по «пинг-понг»-механизму, необходимо допустить возможность протекания ферментативной реакции лишь с одним из субстратов. Известно, что KCN или другой ко-субстрат в отсутствие цистеина не претерпевает никаких ферментативных превращений [5]. Если бы фермент осуществлял катализ в присутствии только одного субстрата — L-цистеина, можно было бы ожидать в отсутствие замещающего агента (S_2 -субстрата) образования H_2S или α -аминоакриловой кислоты (или хотя бы изотопного замещения α -H-атома). Однако при действии фермента в отсутствие ко-субстрата не наблюдали образования из L-цистеина того или другого из возможных продуктов реакции [3, 4]. Резистентность этих лиаз к N-этилмалеимиду также может указывать на отсутствие коэзим-иминоакрилатного комплекса в ходе ферментативного превращения субстратов [10, 11].

Учитывая вышесказанное, рассмотрим применимость механизмов последовательных двухсубстратных реакций к экспериментальным данным, полученным при измерении начальных скоростей изучаемой реакции.

Такие реакции, как указывалось выше, могут протекать по упорядоченному или неупорядоченному механизму. Упорядоченный механизм можно описать следующим выражением [8]:



Скорость реакций зависит от концентрации тройного комплекса ES_1S_2 :

$$v = k_{\text{кат}} [ES_1S_2].$$

Для получения полного выражения для скорости реакции необходимо определить значения всех констант диссоциации фермент-субстратных комплексов:

$$K_{s_1} = \frac{[E][S_1]}{[ES_1]} \quad \text{и} \quad K_{s_2} = \frac{[S_2][ES_1]}{[ES_1S_2]}.$$

Исходя из уравнения постоянства общей концентрации фермента

$$[E]_0 = [E] + [ES_1] + [ES_1S_2]$$

и полагая, что мы измеряем начальные скорости реакции по концентрации продуктов, а также что протеканием обратного процесса можно пренебречь, получаем

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S_1] [S_2]}{[S_1] [S_2] + [S_1] K_{s_2} + K_{s_1} K_{s_2}},$$

или, в двойных обратных величинах,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_{s_2}}{V} \cdot \frac{1}{[S_2]} + \frac{K_{s_1} K_{s_2}}{V} \cdot \frac{1}{[S_1]} \cdot \frac{1}{[S_2]}.$$

При построении графиков Лайнуивера — Берка при переменном значении $[S_1]$ и фиксированных значениях $[S_2]$ получаем серию прямых, отсекающих на оси ординат значения $\frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_{s_2}}{[S_2]} \right)$, а на оси абсцисс — значения $-\frac{1}{K_{s_1}} \left(1 + \frac{[S_2]}{K_{s_2}} \right)$.

Точка пересечения пучка прямых имеет следующие координаты:

$$\left(\frac{1}{[S_1]} \right)_{\text{пер}} = -\frac{1}{K_{s_1}}$$

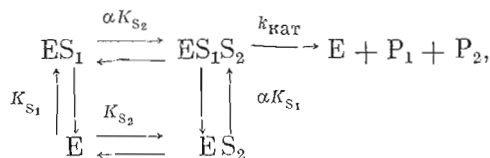
и

$$\left(\frac{1}{v} \right)_{s_2} = +\frac{1}{V}.$$

Следовательно, точка пересечения должна лежать во втором квадранте. При построении графиков Лайнуивера — Берка при переменных значениях $[S_2]$ и фиксированных значениях $[S_1]$ получаем серию прямых, отсекающих на оси ординат значение $1/V$, а на оси абсцисс $-1/[K_{s_2}(1 + K_{s_1}/[S_1])]$ и пересекающихся в точке $(0, 1/V)$ на оси ординат.

Поскольку оба построения (рис. 1), по экспериментальным данным, дают серию прямых, пересекающихся в третьем квадранте, предположение о наличии упорядоченного механизма присоединения субстратов в реакции, катализируемой циаоаланинсинтазой, отпадает.

Неупорядоченный механизм может быть описан следующей схемой



где

$$\begin{aligned} K_{s_1} &= \frac{[E][S_1]}{[ES_1]}; & K_{s_2} &= \frac{[E][S_2]}{[ES_2]}; \\ \alpha K_{s_1} &= \frac{[ES_2][S_1]}{[ES_1S_2]}; & \alpha K_{s_2} &= \frac{[ES_1][S_2]}{[ES_1S_2]}. \end{aligned}$$

Фактор α характеризует взаимозависимость связывания субстратов ферментом. При $\alpha < 1$ образование тройного комплекса предпочтительнее двойных фермент-субстратных комплексов; при $\alpha > 1$, наоборот, образование тройного комплекса менее благоприятно по сравнению с образова-

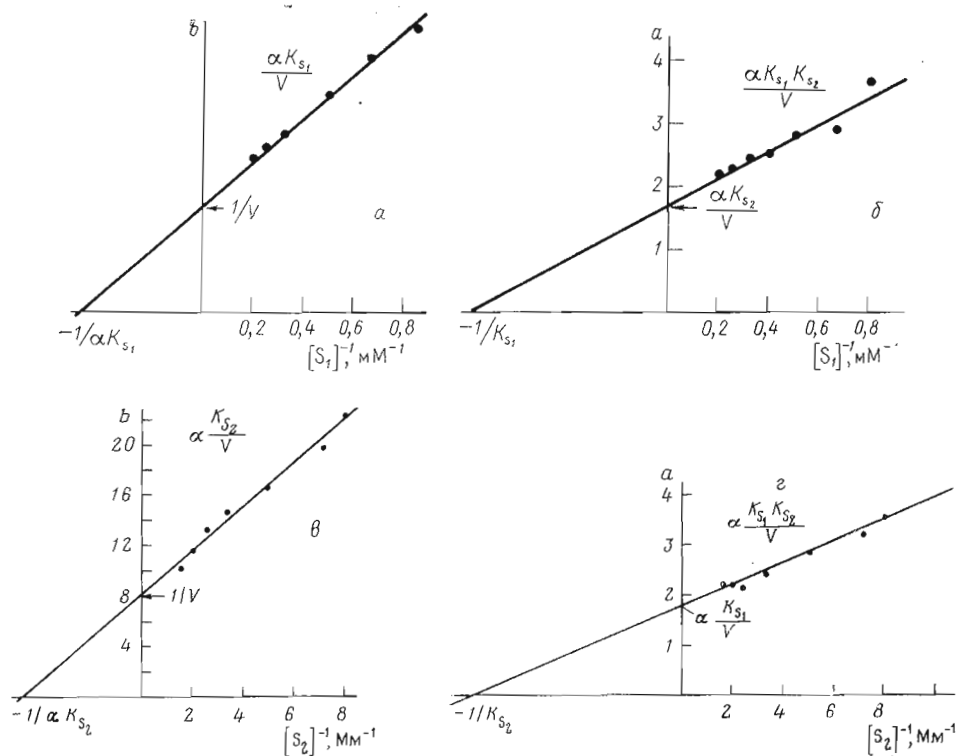


Рис. 2. Графики зависимости отсечений b на оси ординат ($a, в$) и тангенсов углов наклонов a ($б, г$) графиков рис. 1 от обратных величин концентраций L -цистеина [S_1] ($a, б$) и KCN [S_2] ($в, г$)

нием двойных комплексов. Выражение для начальной скорости реакции, полученное исходя из уравнения материального баланса (или постоянства концентрации фермента)

$$[E]_0 = [E] + [ES_1] + [ES_2] + [ES_1S_2]$$

и определяемое концентрацией $[ES_1S_2]$

$$v = k_{\text{кат}} [ES_1S_2],$$

дается формулой

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S_1] [S_2]}{[S_1] [S_2] + \alpha K_{s_1} [S_2] + \alpha K_{s_2} [S_1] + \alpha K_{s_1} K_{s_2}}$$

или, в двойных обратных величинах,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{\alpha K_{s_1}}{V} \cdot \frac{1}{[S_1]} + \frac{\alpha K_{s_2}}{V} + \frac{1}{[S_2]} + \frac{\alpha K_{s_1} K_{s_2}}{V} \cdot \frac{1}{[S_1]} \cdot \frac{1}{[S_2]}.$$

При постоянных фиксированных значениях $[S_2]$ и переменных $[S_1]$ получаем пучок прямых в координатах Лайнуивера — Берка с отсечениями на оси ординат значения

$$\frac{1}{V} \left(1 + \frac{\alpha K_{s_2}}{[S_2]} \right),$$

на оси абсцисс — значения $-\frac{1}{\alpha K_{s_1}} \cdot \frac{[S_2] + \alpha K_{s_2}}{[S_2] + K_{s_2}}$ с тангенсом угла наклона, равным

$\frac{\alpha K_{s_1}}{V} \left(1 + \frac{K_{s_2}}{[S_2]} \right)$, и точкой пересечения с координатами

$$\left(\frac{1}{[S_1]} \right)_{\text{пер}} = -\frac{1}{K_{s_1}} \quad \text{и} \quad \left(\frac{1}{v} \right)_{\text{пер}} = \frac{1}{V} (1 - \alpha).$$

**Константы реакции образования цианоаланина и H_2S
из L -цистеина (S_1) и KCN (S_2), катализируемой
 β -цианоаланинсинтазой**

Константа	При $[\text{S}_1]$ const	При $[\text{S}_2]$ const
V , усл. ед.	$120,0 \pm 3,8$	$120,0 \pm 5,5$
$k_{\text{кат}}$, с^{-1}	$83,2 \pm 2,6$	$83,2 \pm 3,8$
K_{S_1} , мМ	$1,27 \pm 0,17$	$1,27 \pm 0,11$
αK_{S_1} , мМ	$2,42 \pm 0,09$	$2,42 \pm 0,13$
K_{S_2} , мМ	$0,124 \pm 0,015$	$0,124 \pm 0,010$
αK_{S_2} , мМ	$0,206 \pm 0,016$	$0,206 \pm 0,014$
α	$1,67 \pm 0,23$	$1,66 \pm 0,18$

Отсюда следует, что точка пересечения при $\alpha < 1$ лежит во втором квадранте, а при $\alpha > 1$ — в третьем. При постоянных значениях $[\text{S}_1]$ и переменном $[\text{S}_2]$ вследствие симметричности уравнения получаем аналогичное выражение.

Как следует из рис. 1, полученные экспериментальные данные соответствуют неупорядоченному механизму с взаимозависимым связыванием субстратов с $\alpha > 1$.

Для определения индивидуальных констант V , K_{S_1} , K_{S_2} и α можно воспользоваться следующим приемом [8]. При построении для фиксированных значений $[\text{S}_2]$ графика зависимости величин отсечений на оси ординат (полученных из графика Лайнуивера — Берка, величина b) от $1/[\text{S}_2]$ получается прямая линия, отсекающая на оси ординат значение $1/V$, а на оси абсцисс — $1/\alpha K_{\text{S}_2}$ и имеющая тангенс угла наклона $\alpha K_{\text{S}_2}/V$. При построении графика зависимости величин тангенса угла наклонов (графиков Лайнуивера — Берка) от $1/[\text{S}_2]$ получаем прямую, отсекающую на оси ординат — $\alpha K_{\text{S}_1}/V$, на оси абсцисс — $1/K_{\text{S}_2}$ и имеющую тангенс угла наклона $\alpha K_{\text{S}_1} K_{\text{S}_2}/V$. Аналогичные константы получены для фиксированных значений $[\text{S}_1]$. На рис. 2 (а — г) приведены такие построения для полученных экспериментальных данных. Рассчитанные константы приведены в таблице.

Совпадение констант при постоянной концентрации $[\text{S}_1]$ или $[\text{S}_2]$ еще раз свидетельствует об адекватности выбранной модели кинетического механизма. Интересной особенностью этой двухсубстратной реакции является лучшее (в 10 раз) связывание второго субстрата реакции (KCN) по сравнению с основным субстратом — цистеином.

Величина $\alpha > 1$ делает пучок прямых в координатах Лайнуивера — Берка близким к параллельным прямым, что может, как мы видели выше, привести к заблуждениям относительно механизма присоединения субстратов. Наличие прямых, близких к параллельным, говорит о том, что повышение скорости реакции при увеличении концентрации одного из субстратов всегда одинаково, независимо от концентрации второго субстрата. Это обстоятельство может быть существенным для регуляции скоростей процессов, протекающих в организме.

Из приведенных данных следует, что в реакции, катализируемой β -цианоаланинсинтазой, присоединение субстратов к ферменту взаимозависимо и протекает по неупорядоченному механизму с образованием тройного комплекса аминокислота — пиридоксаль- P -фермент — косубстрат.

Этот кинетический подход может быть полезен для ориентировочного определения лиаз, принадлежащих к разным подгруппам [12].

Экспериментальная часть

Получение фермента. β -Цианоаланинсинтазу выделяли из проростков синего люпина по ранее описанному методу [2, 3] с небольшими модификациями. В работе использовали препараты фермента 50%-ной чистоты с уд. акт. 17 мкмоль в 1 мин на 1 мг белка M 52000.

Кинетические измерения. Начальные скорости реакции определяли, исходя из линейной зависимости прироста поглощения при 360 нм в первые 3 мин инкубации цианоаланинсинтазы с субстратами в термостатированной кювете регистрирующего спектрофотометра Beckman (США) при 30°, используя шкалу 0,5. Реакционная смесь в объеме 2,0 мл содержала: 200 мкмоль трис-НСl-буфера (рН 8,8), 0,4 мкмоль $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, L-цистеин (1,25—5,0 мМ), KCN (0,125—0,6 мМ). Реакцию начинали добавлением к реакционной смеси 20 мкл раствора цианоаланинсинтазы (5 мЕ).

Значения кажущихся K_m определяли методом двойных обратных величин по Лайнуиверу — Берку для каждого субстрата в условиях различных концентраций другого, исходя из начальных скоростей реакций. При обработке результатов расчеты значений V и K_s проводили, используя метод наименьших квадратов на ЭВМ Hewlett-Packard.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hendrickson H. R., Conn E. E. (1968) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2632—2640.
2. Акопян Т. Н., Горыаченкова Е. В. (1974) Abstracts of USA—USSR Symposium on Biological Pyridoxal Catalysis, Leningrad, p. 9.
3. Акопян Т. Н., Braunstein A. E., Горыаченкова Е. В. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4—6.
4. Акопян Т. Н., Толоса Э. А., Горыаченкова Е. В., Браунштейн А. Е. (1975) *Био-орган. химия*, **1**, 1481—1488.
5. Braunstein A. E., Горыаченкова Е. В. (1976) *Biochimie*, **58**, 5—17.
6. Толоса Э. А., Маслова Р. Н., Горыаченкова Е. В. (1975) *Биохимия*, **40**, 248—256.
7. Tolosa E. A., Maslova R. N., Горыаченкова Е. В., Willhardt I. H., Braunstein A. E. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **53**, 429—436.
8. Cleland W. W. (1963) *Biochim. et biophys. acta*, **67**, 104—196.
9. Cleland W. W. (1970) in *The Enzyme* (P. Boher, ed.), 3rd Ed., v. 2, pp. 1—65, Acad. Press, N. Y.
10. Flavin M., Slaughter C. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1434—1444.
11. Davis L., Metzler D. E. (1972) in *The Enzymes* (P. Boyer, ed.), 3rd Ed., v. 7, pp. 33—74, Acad. Press, N. Y.
12. Браунштейн А. Е. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, **5**, 629—642.

Поступила в редакцию
11.IV.1978

KINETICS OF β -CYANOALANINE SYNTHASE REACTIONS

TOLOSA E. A., KOZLOV L. V., RABINKOV A. G., GORYACHENKOVA E. V.

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

Steady-state kinetics have been studied of L-cysteine desulfhydration in the presence of KCN catalyzed by β -cyanoalanine synthase, a pyridoxal-P dependent enzyme. The enzyme preparations obtained from blue lupine seedlings with specific activity of 10-15 $\mu\text{M}/\text{min}\cdot\text{mg}$ were used. The V_1 , K_{s1} , K_{s2} , and α values were determined from the initial rate measurements under conditions of constant L-cysteine and variable KCN concentrations or vice versa. Experimental data showed that substrate binding is mutually dependent and follows sequential random mechanism with the formation of ternary aminosubstrate: pyridoxal-P-enzyme: co-substrate complex characterized by factor $\alpha > 1$.