

УДК 577.158

БИОХИМИЯ

В. Ц. Айказин, Р. М. Налбандян

Ингибирование лакказы Б из *Coriolus versicolor* высокими концентрациями субстрата и ионами хлора

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятинем 27/XI 1973)

Для выяснения механизма деструкции древесины под действием разрушающих ее грибов необходимо подробное исследование ферментов, участвующих в этих процессах. В ранее опубликованной работе (1) мы сообщили о результатах сравнительного исследования действия различных анионных ингибиторов на лакказу. В настоящей работе была сделана попытка более подробного исследования ингибирующего действия ионов хлора на лакказу Б.

Лакказу Б (ФК 1. 10. 3. 2. п-дифенол: O_2 оксидоредуктаза) из грибов *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel получали по методу Фаареза и Рейнаммара (2) с некоторыми модификациями (1). Некоторые штаммы этого гриба способны продуцировать два изофермента лакказы (лакказа А и лакказа Б), тогда как другие штаммы продуцируют только один из этих изоферментов (3). В нашем распоряжении имелся штамм 45 (из микологического музея Ленинградской лесотехнической Академии), который, как мы обнаружили, продуцирует только лакказу Б. В качестве субстрата использовали очищенный возгонкой пирокатехин. Активность фермента определяли спектрофотометрически ($\lambda_{max} = 410$ мкм), по накоплению продукта реакции.

Исследование зависимости скорости реакции от концентрации субстрата проводили при концентрации фермента $2 \cdot 10^{-7}$ М. Концентрацию субстрата изменяли от 1 до $1 \cdot 10^{-3}$ М (в 0,1 М фосфатном буфере, рН 6,0). Определение скоростей в таком широком диапазоне начальных концентраций субстрата позволило выявить кинетические особенности этой ферментативной реакции. При высоких концентрациях субстрата наблюдается ингибирование фермента, о чем свидетельствует наличие максимума в зависимости скорости реакции от логарифма концентрации субстрата (рис. 1,а) и увеличение обратной скорости при низких значениях $1/[S_0]$ на графиках Лайнуивера-Берка (рис. 1,б).

Аналогичная сложная зависимость наблюдается также в присутствии хлорида. В опытах по ингибированию ионами хлора инкубацию фермента с хлоридом ($4 \cdot 10^{-3}$ М) проводили в фосфатном буфере, рН

6,0, в отсутствие субстрата в течение 10 мин при 15°C. Субстрат к инкубационной смеси добавляли непосредственно перед измерениями. Как видно из рис. 2, график в координатах Лайнуивера-Берка содержит два прямолинейных участка (помимо участка ингибирования фермента высокими концентрациями субстрата). Таким образом, в пределах каждого из этих двух участков соблюдается уравнение Ми-

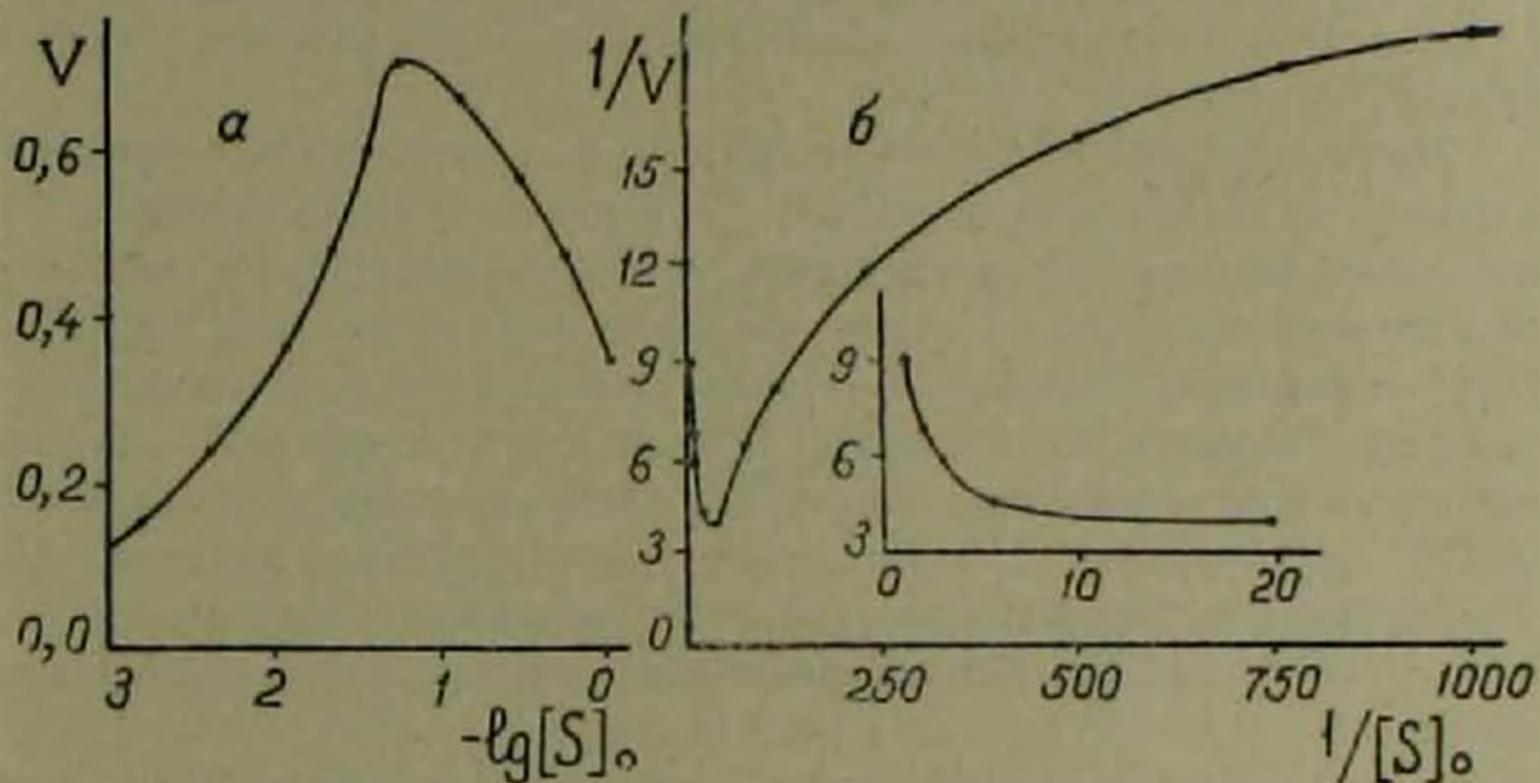


Рис. 1. Ингибирование лакказы субстратом:

a — зависимость скорости реакции от отрицательного логарифма концентрации субстрата, *б* — та же зависимость в координатах Лайнуивера-Берка (внутри дана развернутая по оси абсцисс часть кривой для низких значений $1/[S]_0$). Значения скоростей (V) рассчитаны из величин оптических плотностей продукта при 410 мик и 1 см кюветах

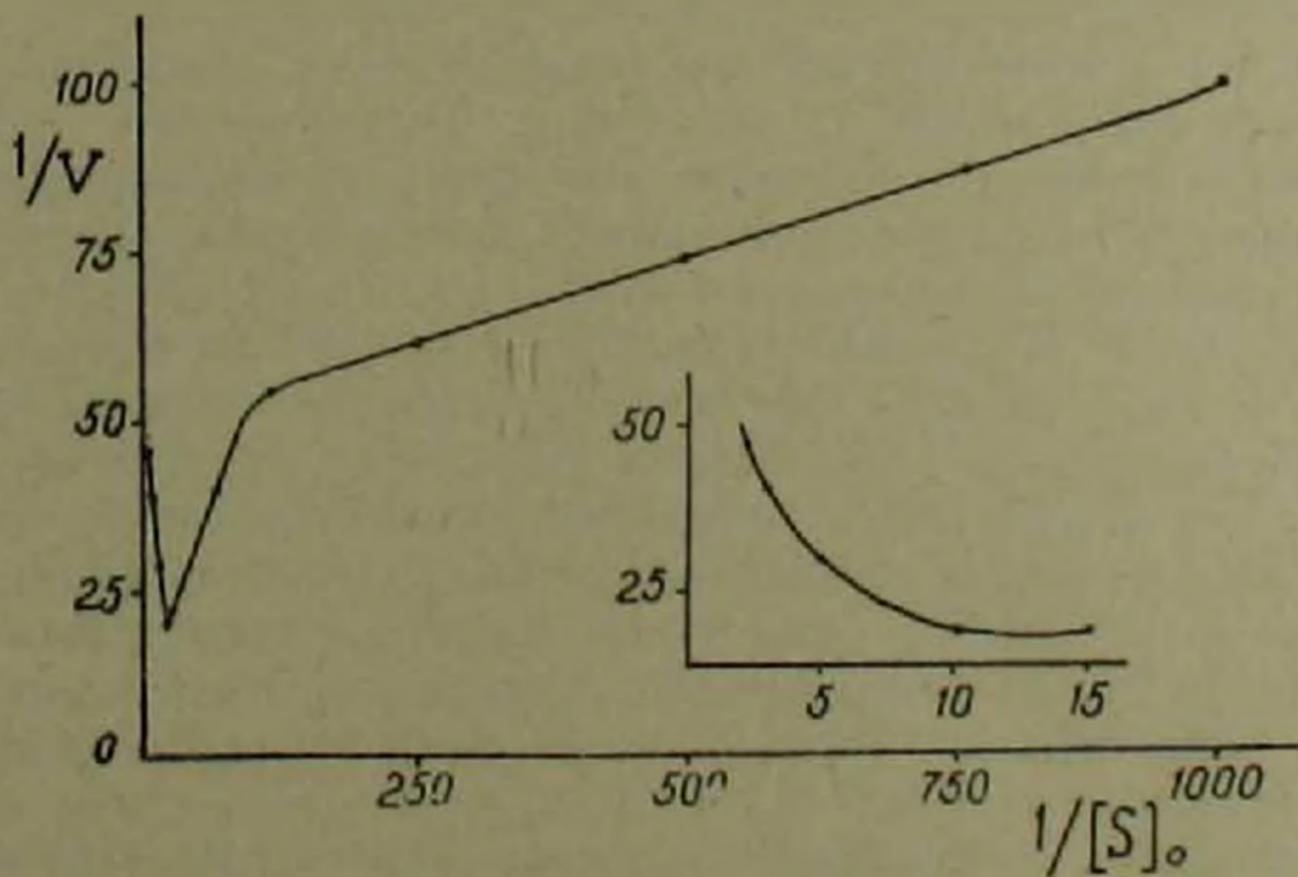


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка в присутствии $4 \cdot 10^{-3}$ М КСI

хаэлиса-Ментен, однако характеризующие их кинетические константы (максимальные скорости и константы Михаэлиса) различны. Соответствующие этим участкам значения максимальных скоростей (V_1 и V_2) и констант Михаэлиса (K_{m_1} и K_{m_2}) могут быть получены обычной экстраполяцией. Экстраполируя участок ингибирования фермента субстратом к оси ординат можно также получить значение «максимальной» скорости при бесконечно больших концентрациях субстрата ($V_{[s] \rightarrow \infty}$). Полученные таким образом из графиков величины приведены в табл. 1.

Наличие в полученном препарате только одного из изоферментов лакказы (лакказы Б) позволяет исключить предположение, что наблюдаемая сложная зависимость в координатах Лайнуивера-Берка обусловлена наличием в препарате двух ферментов (или изоферментов), обладающих лакказной активностью. Поэтому наблюдаемое отступление от линейной зависимости должно быть объяснено на основе одного из следующих предположений: кооперативным взаимодействием между идентичными центрами, наличием в ферменте двух не взаимодействующих центров (гетерогенностью активных центров) или наличием двух форм субстратов, способных реагировать с единственным центром.

Однако, поскольку полученная зависимость в координатах Лайнуивера-Берка имеет выраженный перегиб, поскольку не обнаруживается s-образность в координатах «скорость—концентрация субстрата», и так как формальные кинетические параметры, определенные для начального и конечного участков в присутствии хлорида свидетельствуют о различном изменении наклона этих участков в присутствии ингибитора, можно исключить предположение, что отклонение графиков Лайнуивера-Берка от линейной зависимости обусловлено кооперативным взаимодействием между идентичными центрами. И если предположить, что в белке имеются два неидентичных и существенно не взаимодействующих центра, то полученные экстраполяцией отдельных участков кажущиеся кинетические параметры, приведенные в табл. 1, характеризуют каждый из этих центров. Поскольку под влиянием хлорида уменьшаются максимальные скорости для обоих центров, а величина константы Михаэлиса увеличивается только для одного центра, механизм ингибирования этих центров хлоридом различен. Один из них ингибируется по «смешанному» типу, тогда как ингибирование другого является строго неконкурентным. Различный механизм ингибирования является некоторым подтверждением предположения о наличии в молекуле лакказы Б двух типов центров. Однако для окончательного подтверждения этого предположения необходимо исследовать более широкий круг субстратов лакказы, включая одноэлектронные субстраты.

Полученные в последнее время данные ЭПР-исследований лакказы А и Б ($4-6$) свидетельствуют в пользу «гетерогенности» входящих в их состав атомов двухвалентной меди. Эти атомы характеризуются сигналами ЭПР, имеющими различные параметры. Имеется по крайней

мере три различных типа меди в белке. В связи с этим естественно предположить, что различные типы атомов меди входят в состав различных активных центров, иначе говоря, гетерогенность активных центров связана с гетерогенностью атомов меди.

Таблица 1

Кажущиеся кинетические параметры лакказы, полученные формальной экстраполяцией отдельных участков сложной зависимости в координатах Лайнувер-Берка

Параметр	В отсутствие ионов хлора	В присутствии ионов хлора ($4 \cdot 10^{-3}M$)
$V[S]_{-}$	0,16	0,015
V_1	0,83	0,07
V_2	0,28	0,02
K_{m_1}	$1,19 \cdot 10^{-2}M$	$2,86 \cdot 10^{-2}M$
K_{m_2}	$0,80 \cdot 10^{-3}M$	$0,80 \cdot 10^{-3}M$

Аналогичная сложная кинетическая зависимость обнаружена для церулоплазмينا, медьсодержащей оксидазы из плазмы крови млекопитающих (7,8). ЭПР спектр этого белка также указывает на наличие трех типов атомов меди на молекулу фермента (5). Таким образом, для медьсодержащих оксидаз возникает общая задача: выявить, сколько атомов меди и какого типа входит в состав каждого из активных центров.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Վ. Յ. ՀԱՅՎԱԶՅԱՆ, Ի. Մ. ՆԱԻՐԱՆՅԱՆ

Coriolus versicolor-ից ստացված P-լակազայի արդելակումը սուրստրատի րարձր կոնցենտրացիաներով և քլորի իոններով

Փայտանյութի քայքայող սնկերի դործունեությունը պարզաբանելու համար անհրաժեշտ է ուսումնասիրել այդ քայքայմանը մասնակցող ֆերմենտները: Տվյալ աշխատանքում, շարունակելով արդելակիչների ազդեցության ուսումնասիրումը փայտի քայքայման պրոցեսին մասնակցող ֆերմենտի՝ լակազայի (ՖԿ 1.10.3.2 պ-դիֆենոլ, O_2 օքսիդոռեդուկտազա) վրա, կատարվել են արգելակման մեխանիզմի և ակտիվ կենտրոնի կառուցվածքի պարզաբանմանը վերաբերվող հետազոտություններ: Ցույց է տրված, որ լակազան ամենայն հավանականությամբ ունի երկու ակտիվ կենտրոն, որոնցից մեկը արդելակվում է «խառն», իսկ մյուսը՝ ոչ մրցակցային ձևով:

Ստացված արդյունքները կարելի է մեկնաբանել մեկ ուրիշ եղանակով՝ ֆերմենտն ունի մեկ ակտիվ կենտրոն, իսկ սուրստրատի տարրեր կոնցենտրացիաների համար ստացված լայնուիվեր-Բերկի կոորդինատներում անոմալ կորերը բացատրվում են սուրստրատի երկու տարրեր վիճակներով, որոնք

առաջանում են ֆերմենտատիվ ուսկցիայի ընթացքում: Ալթերնատիվների մեջ ընտրություն կատարելու համար անհրաժեշտ է կատարել լրացուցիչ փորձեր մեկ էլեկտրոնային սուրստրատների հետ: Առայժմ նախապատվությունը տրվում է երկկենտրոն ֆերմենտին, քանի որ էՊՌ հետազոտություններով ցույց է տված, որ լակազայի կազմում գտնվող պղնձի ատոմներն ունեն տարրեր շրջապատում:

ЛИТЕРАТУРА — ՎՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ В. Ц. Айказян, Р. М. Налбандян. ДАН Арм. ССР, т. XLIX, № 4, (1969).
² G. Fuhræus, B. Reinhammar, Acta Chem. Scand., 21, 2367 (1967). ³ S.-P. W. Tang, J. E. Coleman, Y. P. Myer, J. Biol. Chem. 243, 4286 (1968). ⁴ B. G. Malmström, B. Reinhammar, T. Vänngård, Biochim. Biophys. Acta, 156, 67 (1968). ⁵ R. Malkin, B. G. Malmström, T. Vänngård, Europ. J. Biochem., 7, 253 (1969). ⁶ R. Malkin, B. G. Malmström, T. Vänngård, Europ. J. Biochem., 10, 324 (1969). ⁷ T. Sekiguchi, I. Nason, Arch. Biochem. Biophys., 138, 319 (1970). ⁸ E. Walaas, R. A. I. Øvstad, O. Walaas, Arch. Biochem. Biophys., 121, 460 (1967).