



УДК 577.15.02 + 577.15.072

**NAD-ЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА
ИЗ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ. ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ
СХЕМЫ ДЕЙСТВИЯ***Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М.,
Березин И. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии*

Проведен кинетический анализ механизма действия NAD-зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий штамма *Bacterium* sp. 1, использующих метанол. Исследована зависимость скорости реакции от концентрации субстратов, ингибирование продуктами и аналогами субстратов. Согласно полученным результатам, кинетическая схема действия формиатдегидрогеназы включает образование тройного фермент-субстратного комплекса. Наиболее вероятен механизм действия с неупорядоченным присоединением субстратов и быстрым установлением равновесия между всеми фермент-субстратными комплексами.

Ранее нами была описана методика выделения и основные свойства NAD-зависимой формиатдегидрогеназы (формиат: NAD-оксидоредуктазы; КФ 1.2.1.2) из бактерий штамма *Bacterium* sp. 1, использующих метанол [1, 2]. По своим характеристикам — молекулярному весу, специфичности по отношению к субстрату и кофактору, величине констант Михаэлиса, рН-зависимости кинетических параметров, ингибированию *n*-хлормеркурибензоатом, дитионитробензоатом, азидом, цианидом — и некоторым другим свойствам формиатдегидрогеназы из *Bacterium* sp. 1 близка к ферментам из ряда других источников [3—5].

Особый интерес представляет изучение кинетических свойств данного фермента как с точки зрения сравнительного исследования механизма действия дегидрогеназ, так и с точки зрения выяснения возможных механизмов регуляции метаболизма метилотрофов, поскольку реакция окисления формиата до углекислого газа является последней и энергетически наиболее выгодной стадией в цепи окисления метанола и других C₁-соединений [6].

Наиболее подробно изучение кинетических свойств было проведено для NAD-зависимых формиатдегидрогеназ, выделенных из высших растений — зерен гороха *Pisum sativum* [3] и из маша *Phaseolus aureus* [7]. В данной работе изучены основные кинетические свойства NAD-зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий штамма *Bacterium* sp. 1, использующих метанол.

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстратов. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации NAD

Сокращение: ХАПАД — 3-(трихлорацетил)-пиридинадениндинуклеотид.

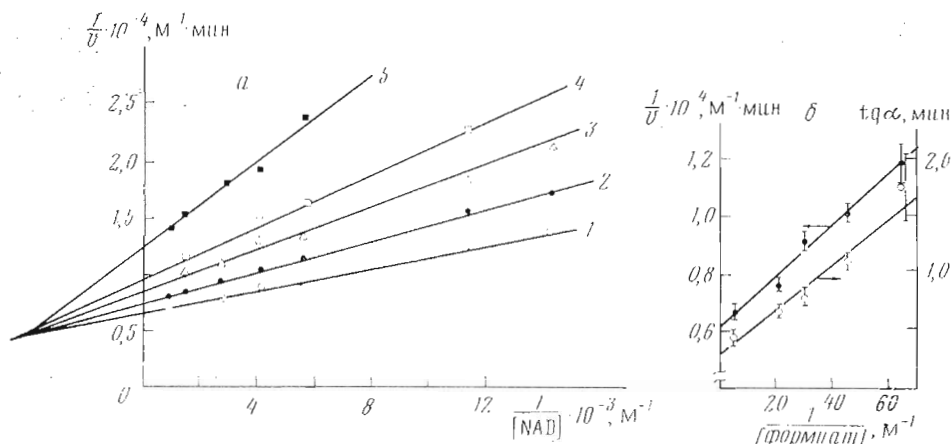


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации NAD; а — в координатах Лайнуивера — Берка (концентрации формиата, М: 1 — $0,15$; 2 — $4,5 \cdot 10^{-2}$; 3 — $3,0 \cdot 10^{-2}$; 4 — $2,25 \cdot 10^{-2}$; 5 — $1,5 \cdot 10^{-2}$); б — зависимость тангенсов углов наклона и отрезков, отсекаемых на оси ординат, от концентрации формиата

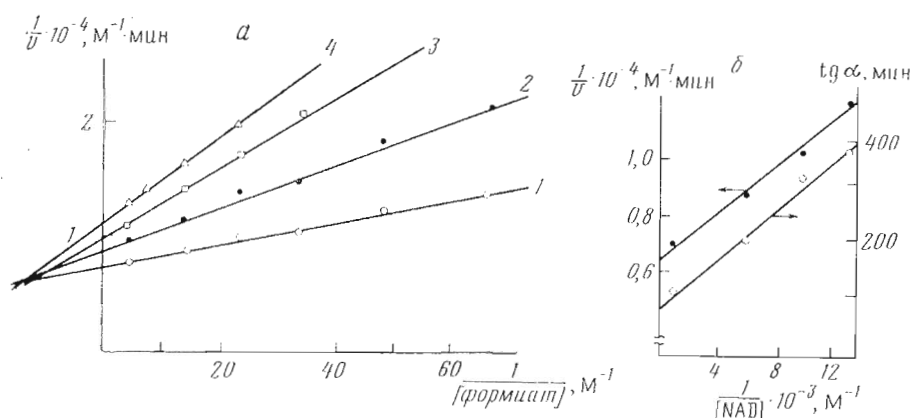


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации формиата; а — в координатах Лайнуивера — Берка (концентрации NAD, М: 1 — $8,8 \cdot 10^{-4}$; 2 — $1,5 \cdot 10^{-4}$; 3 — $1,0 \cdot 10^{-4}$; 4 — $7,5 \cdot 10^{-5}$); б — зависимость тангенсов угла наклона и отрезков, отсекаемых на оси ординат, от концентрации NAD

при нескольких фиксированных концентрациях формиата в координатах Лайнуивера — Берка представляет собой совокупность прямых, пересекающихся в левом верхнем квадранте (рис. 1а). Аналогичная зависимость была получена при варьировании концентрации формиата и постоянных концентрациях NAD (рис. 2а). Тангенсы углов наклона этих прямых и отрезки, отсекаемые ими на оси ординат, в пределах экспериментальных ошибок линейно зависят от величины обратной концентрации фиксированного субстрата (рис. 1б и 2б).

Как было показано [8], наличие точки пересечения для прямых, построенных в координатах двойных обратных величин, указывает на образование в ходе реакции тройного фермент-субстратного комплекса.

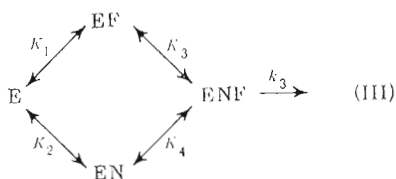
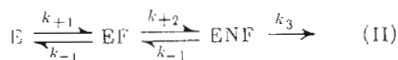
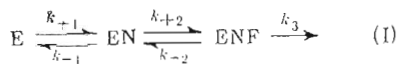
Наблюдаемая зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстратов описывается следующим выражением:

$$v = \frac{V [F] [N]}{K_{NF} + K_N [F] + K_F [N] + [N] [F]}, \quad (1)$$

где v — начальная скорость реакции; $[N]$ и $[F]$ — концентрации NAD и формиата; K_N и K_F — константы Михаэлиса для NAD и формиата; K_{NF} — смешанная константа; V — максимальная скорость реакции.

Значения констант, рассчитанные из трех независимых серий экспериментов, составили: $K_N = (6,4 \pm 2,1) \cdot 10^{-5}$ М, $K_F = (1,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-2}$ М, $K_{NF} = (4,2 \pm 2,0) \cdot 10^{-6}$ М². Константы Михаэлиса, определенные при насыщающих концентрациях одного из субстратов, равны $(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ М для NAD и $(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$ М для формиата.

В рамках наблюдаемой зависимости v от концентрации субстратов, представленной формулой (1), возможны механизмы реакции с обязательным последовательным присоединением субстратов (схемы I и II), а также частные случаи механизма с неупорядоченным присоединением субстратов (схема III):

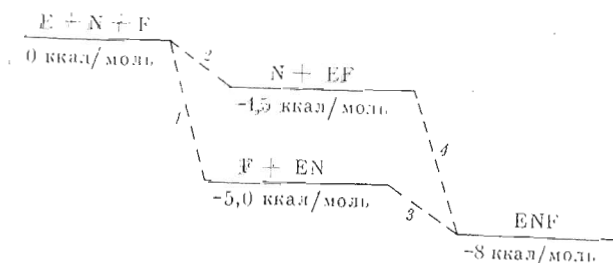


Кинетическое уравнение для общего механизма с неупорядоченным присоединением субстратов приобретает форму (1) при условии быстрого установления равновесия между свободным ферментом и фермент-субстратными комплексами [9] или же преимущественного протекания реакции через один из возможных двойных комплексов [10]. Поэтому в дальнейшем для проведения анализа мы будем рассматривать кинетические уравнения для схем I и II в стационарном приближении, а кинетическое уравнение для схемы III — при условии быстрого установления равновесия между всеми фермент-субстратными комплексами.

Если допустить, что реализуется схема III с неупорядоченным присоединением субстратов и быстрым установлением равновесия между фермент-субстратными комплексами, то константа Михаэлиса для NAD равна K_3 (см. обозначения на схеме III), а константа Михаэлиса для формиата — K_4 . Общее уравнение для начальной скорости реакции может быть представлено в виде

$$v = \frac{k_3 [E]_0 [N] [F]}{K_1 K_3 + K_3 [F] + K_4 [N] + [N] [F]} = \frac{k_3 [E]_0 [N] [F]}{K_2 K_4 + K_3 [F] + K_4 [N] + [N] [F]} \quad (2)$$

Из экспериментальных данных могут быть найдены все константы, входящие в уравнение (2): $K_1 = K_{NF}/K_N = 0,07$ М; $K_2 = K_{NF}/K_F = 2,2 \cdot 10^{-4}$ М; $K_3 = K_N = 6,4 \cdot 10^{-5}$ М; $K_4 = K_F = 0,019$ М. Анализ значений констант показывает, что посадка первого субстрата в рамках данной схемы несколько облегчает присоединение второго. Это следует из диаграммы свободных энергий промежуточных комплексов:



В соответствии с правилом Поляни — Семенова [11] можно предположить, что активационный барьер по любому из путей будет тем ниже, чем больше падение свободной энергии системы. Это означает, что энергия активации по пути 1 будет несколько ниже, чем по пути 2. На втором этапе превращения (пути 3 и 4) будет наблюдаться обратное соотношение. В результате скорости реакции по двум альтернативным путям будут приблизительно равны, т. е. последовательность посадки субстратов в рамках данной схемы не имеет существенного значения. Учитывая это, кинетику реакции можно приблизительно описать симметричной схемой, в которой субстратные константы перекрестно равны: $K_1 = K_4$ и $K_2 = K_3$. В этом случае кинетическое уравнение (2) упрощается:

$$v = \frac{k_3 [E]_0 [F] [N]}{(K_N + [N])(K_F + [F])} = \frac{k_3 [E]_0 [F] [N]}{K_N K_F + K_F [N] + K_N [F] + [F] [N]} \quad (3)$$

Из сравнения (1) и (3) следует, что должны соблюдаться равенства $K_{NF} = K_N K_F$. С учетом ошибок эксперимента $K_N K_F = (1,2 \pm 0,8) \cdot 10^{-6} \text{ M}^2$. Верхний предел этого произведения близок к нижнему значению величины $K_{NF} = (4,2 \pm 2,0) \cdot 10^{-6} \text{ M}^2$, определенной экспериментально, что свидетельствует о возможности использования формулы (3) для приблизительного описания процесса, несмотря на некоторую взаимозависимость в связывании субстратов.

Если реализуется схема I, в условиях стационарности кинетическое уравнение имеет вид

$$v = \frac{k_3 [E]_0 [N] [F]}{k_{-1}(k_{-2} + k_3)/k_{+1}k_{+2} + (k_{-2} + k_3)[N]/k_{+2} + k_3[F]/k_{+1} + [N][F]} \quad (4)$$

откуда с учетом экспериментальных значений K_N , K_F , K_{NF} и k_3 ($k_3 = 6 \text{ c}^{-1}$ [2]) $k_{-1} = 22 \text{ c}^{-1}$, $k_{+1} = 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

Аналогично для случая реализации схемы II $k_{-1} = 21 \text{ c}^{-1}$, $k_{+1} = 3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

При концентрациях NAD и формиата одного порядка с константами Михаэлиса скорости реакций образования фермент-субстратных комплексов для схемы I и для схемы II сравнимы с величиной каталитической константы.

Таким образом, в рамках полученных экспериментальных зависимостей скорости реакции от концентрации субстратов схема с неупорядоченным присоединением субстратов и быстрым установлением равновесия между фермент-субстратными комплексами, а также стационарные схемы с упорядоченным присоединением субстратов не противоречат допущениям, принятым при их построении. Поэтому для выбора между данными схемами необходима дополнительная информация. Такая информация может быть получена из исследования ингибирования фермента аналогами субстратов, а также продуктами реакции.

Ингибирование аналогами формиата. При варьировании концентрации формиата в присутствии азида наблюдается конкурентное ингибирование (рис. 3а). При варьировании концентрации NAD азид выступает бесконкурентным ингибитором (рис. 3б). Степень торможения ферментативной активности не зависит от порядка добавления субстратов. Время прединкубации (по 2 ч) фермента с азидом, а также фермента с азидом и NAD не влияет на величину активности. В отличие от данных Охиама и Ямасаки, полученных при изучении формиатдегидрогеназы из *Pisum sativum* [3], наши эксперименты не показали уменьшения максимальной скорости реакции в присутствии азида (рис. 3).

Нитрат, как и азид, является конкурентным ингибитором по отношению к формиату и бесконкурентным ингибитором по отношению к NAD. Зависимости от концентрации ингибиторов тангенсов углов наклона графиков v^{-1} от $[F]^{-1}$ при варьировании концентрации формиата, а также

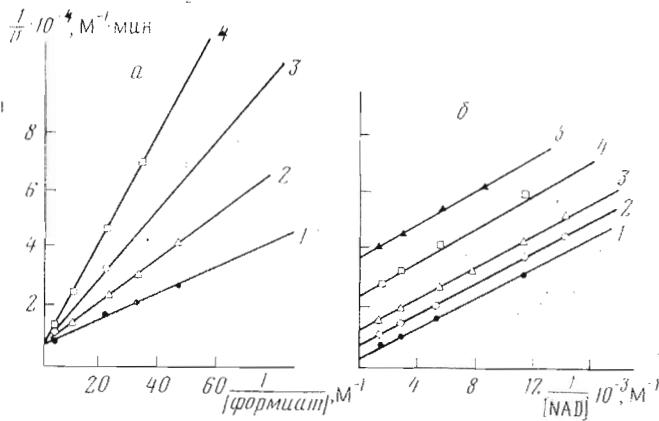
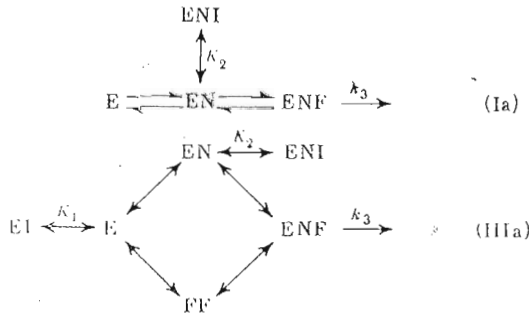


Рис. 3. Ингибирование KN_3 ; а — при постоянной концентрации NAD ($3,5 \cdot 10^{-4}$ М) (концентрации KN_3 , М: 1 — 0; 2 — $2,9 \cdot 10^{-7}$; 3 — $5,9 \cdot 10^{-7}$; 4 — $1,17 \cdot 10^{-6}$); б — при постоянной концентрации формиата (0,375 М) (концентрации KN_3 , М: 1 — 0; 2 — $2,8 \cdot 10^{-6}$; 3 — $5,5 \cdot 10^{-6}$; 4 — $1,1 \cdot 10^{-5}$; 5 — $2,2 \cdot 10^{-5}$)

величин отрезков, отсекаемых графиками v^{-1} от $[\text{N}]^{-1}$ на оси ординат, при варьировании концентрации NAD как в случае нитрата, так и в случае азида линейны.

С учетом образования возможных непродуктивных комплексов Ei и ENI (I — молекула ингибитора) схемы I и III принимают вид



Соответствующие схемам Ia и IIIa кинетические уравнения могут быть записаны следующим образом:

$$\frac{V}{v} = 1 + \frac{K_N}{[\text{N}]} + \frac{K_F}{[\text{F}]} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_2} \right) + \frac{K_{\text{NF}}}{[\text{N}][\text{F}]}, \quad (5)$$

$$\frac{V}{v} = 1 + \frac{K_N}{[\text{N}]} + \frac{K_F}{[\text{F}]} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_2} \right) + \frac{K_{\text{NF}}}{[\text{N}][\text{F}]} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_1} \right), \quad (6)$$

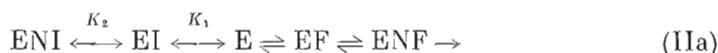
откуда вытекает, что схемы Ia и IIIa (последняя при условии $\frac{[\text{I}]}{K_1} \ll 1$) согласуются с наблюдаемыми зависимостями.

Для расчета величин констант ингибирования при варьировании концентрации формиата рассчитывались из зависимости от концентрации ингибитора тангенса угла наклона графиков v^{-1} от $[\text{F}]^{-1}$ ($\text{tg} = \alpha([\text{I}]) = \frac{1}{V} \cdot \frac{K_{\text{NF}}}{[\text{N}]} + \frac{K_F}{V} + \frac{K_F}{V} \frac{[\text{I}]}{K_2}$, откуда $K_2 = \beta^{-1} \frac{K_F}{V}$, где β равно тангенсу угла наклона α от $[\text{I}]$). Величина константы ингибирования составила для азида $(0,98 \pm 0,6) \cdot 10^{-7}$ М и для нитрата $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ М.

Константы ингибирования при варьировании концентрации NAD

рассчитывали из зависимости от концентрации ингибитора величин отрезков, отсекаемых на оси ординат графиками v^{-1} от $[N]^{-1}$ (величина отрезка $= l([I]) = \frac{1}{v} + \frac{1}{v} \frac{K_F}{[F]} + \frac{1}{v} \frac{K_F}{[F]} \frac{[I]}{K_2}$; $K_2 = \beta^{-1} \frac{K_F}{[F]} \frac{1}{v}$, где β — тангенс угла наклона графика l от $[I]$). При варьировании концентрации NAD константы ингибирования составили для азида $(2,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$ и для нитрата $(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ М.

С точки зрения полученных результатов схема II, в которой первым субстратом является формиат, представляется маловероятной. С учетом возможных непродуктивных комплексов она принимает следующий вид:



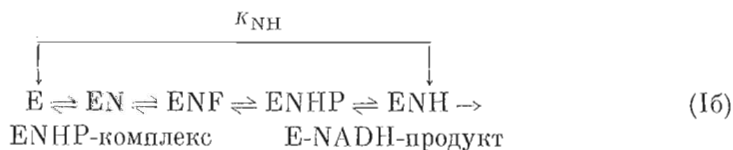
В рамках кинетического уравнения для схемы IIa

$$\frac{v}{v} = 1 + \frac{K_N}{[N]} \left(1 + \frac{[I]}{K_1} + \frac{[I][N]}{K_1 K_2} \right) + \frac{K_{NF}}{[N][F]} \left(1 + \frac{[I]}{K_1} + \frac{[I][N]}{K_1 K_2} \right) \quad (7)$$

наблюдаемые зависимости скорости реакции от концентрации ингибиторов не могут быть объяснены при любых соотношениях K_1 и K_2 .

Ингибирование NADH и аналогом NAD. При варьировании концентрации NAD выступает смешанным неконкурентным ингибитором NADH (рис. 4a). При варьировании концентрации формиата и постоянной концентрации NAD наблюдается ингибирование, по своему характеру близкое к конкурентному (рис. 4б). Аналогичные результаты были получены при использовании в качестве ингибитора аналога NAD 3-(трихлорацетил)-пиридинадениндинуклеотида (ХАПАД) — соединения, в котором амидная группа никотинамидного кольца замещена на остаток $C(O)CCl_3$ (рис. 5a, б). Тангенсы углов наклона графиков v^{-1} от $[N]^{-1}$ и v^{-1} от $[F]^{-1}$ при варьировании концентраций NAD и формиата, а также величины отрезков, отсекаемых ими на оси ординат при варьировании концентрации NAD, линейно зависят от концентрации NADH и ХАПАД.

Рассмотрение схемы с начальным присоединением NAD с учетом данных по ингибированию NADH и ХАПАД показывает (схема Iб), что NADH не может быть последним продуктом реакции, поскольку последний продукт должен взаимодействовать со свободной формой фермента, т. е. с той же формой, с которой взаимодействует первый субстрат, и, следовательно, в рамках данной схемы NADH может быть конкурентным по отношению только к NAD (первому субстрату) и не может быть конкурентным по отношению ко второму субстрату (формиату) [12].



Рассматриваемая схема описывается кинетическим уравнением

$$\frac{v}{v} = 1 + \frac{K_N}{[N]} \left(1 + \frac{[NH]}{K_{NH}} \right) + \frac{K_F}{[F]} + \frac{K_{NF}}{[N][F]} \left(1 + \frac{[NH]}{K_{NH}} \right). \quad (8)$$

На рис. 6 представлены зависимости от концентрации NADH тангенсов угла наклона графиков v^{-1} от $[N]^{-1}$, полученных при двух концентрациях формиата (0,03 и 0,3 М). Величины эффективных констант ингибирования K_{NH} , рассчитанные из точек пересечения этих графиков с осью абсцисс, различаются в 4 раза, в то время как на основании уравнения (5) значения эффективных констант не должны зависеть от концентрации второго субстрата (формиата) при варьировании концентрации первого суб-

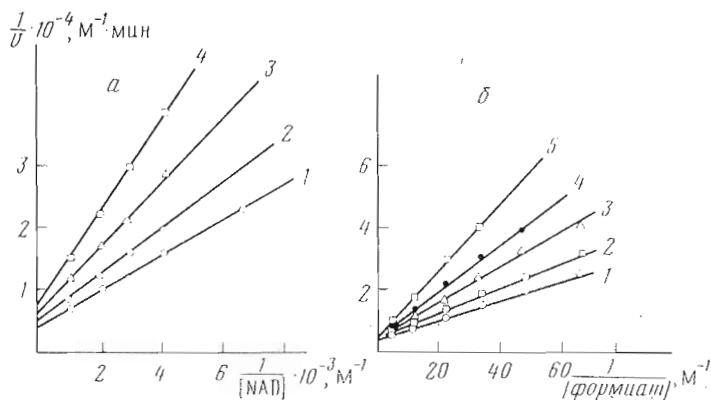


Рис. 4. Ингибирование NADH; *a* — при постоянной концентрации формиата ($4,5 \cdot 10^{-2}$ M) (концентрации NADH, M: 1 — 0; 2 — $7,8 \cdot 10^{-5}$; 3 — $2,3 \cdot 10^{-4}$; 4 — $3,9 \cdot 10^{-4}$); *b* — при постоянной концентрации NAD ($3,3 \cdot 10^{-4}$ M) (концентрации NADH, M: 1 — 0; 2 — $4,3 \cdot 10^{-5}$; 3 — $8,5 \cdot 10^{-5}$; 4 — $1,7 \cdot 10^{-4}$; 5 — $2,55 \cdot 10^{-4}$)

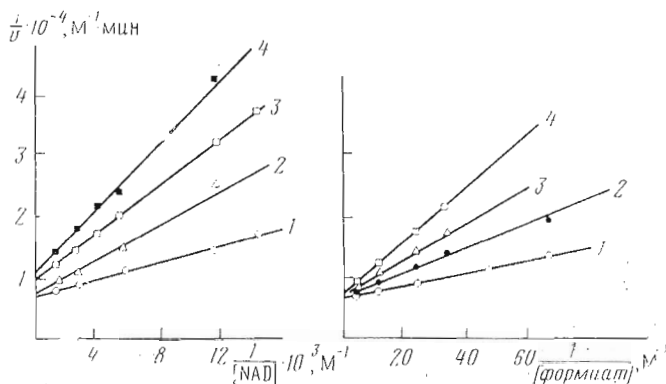
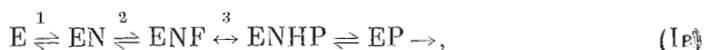


Рис. 5. Ингибирование XАПАД; *a* — при постоянной концентрации формиата ($3 \cdot 10^{-2}$ M) (концентрации XАПАД, M: 1 — 0; 2 — $2,3 \cdot 10^{-4}$; 3 — $4,6 \cdot 10^{-4}$; 4 — $6,9 \cdot 10^{-4}$); *b* — при постоянной концентрации NAD ($2,2 \cdot 10^{-4}$) (концентрации XАПАД, M: 1 — 0; 2 — $2,3 \cdot 10^{-4}$; 3 — $4,6 \cdot 10^{-4}$; 4 — $6,9 \cdot 10^{-4}$)

страта (NAD). Таким образом, экспериментальные результаты не соответствуют зависимостям, которые можно было бы ожидать на основании схемы 1б.

При условии, что NAD является первым субстратом, для объяснения конкурентного ингибирования восстановленной формой кофермента при варьировании концентрации формиата необходимо предположить, что NADH — первый продукт и реакция протекает без лимитирующего тройного комплекса, т. е. согласно механизму Теорелла — Чанса [13]:



где стадия 3 протекает достаточно быстро и наблюдается установление равновесия между комплексами E-NAD-формиат и E-NADH-продукт в реакции $EN + F \rightleftharpoons EP + NH$. Однако данная схема не объясняет характера ингибирования аналогом NAD — XАПАД.

Идентичный характер ингибирования XАПАД и NADH свидетельствует о том, что ингибирование NADH можно рассматривать скорее как ингибирование аналогом NAD, а не как ингибирование продуктом реакции. Конкурентное ингибирование XАПАД и NADH по отношению к фор-

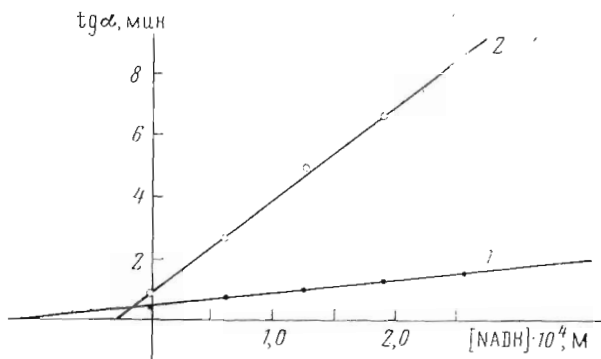


Рис. 6. Зависимость от концентрации NADH тангенсов углов наклона графиков v^{-1} от $[N]^{-1}$ при концентрациях формата: 1 — 0,3; 2 — 0,03 М

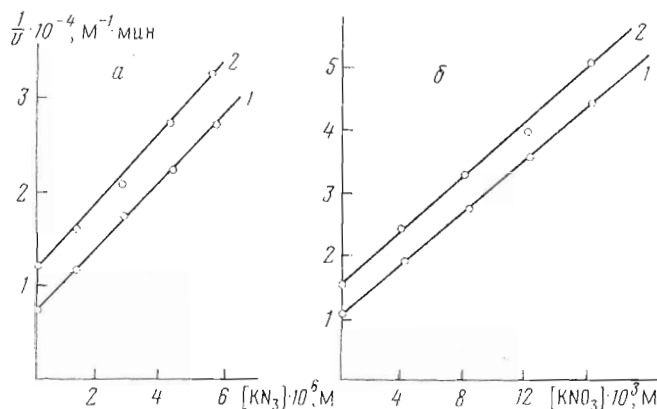


Рис. 7. Двухкомпонентное ингибирование; а — зависимость начальной скорости реакции от концентрации KN_3 (концентрации NADH: 1 — 0; 2 — $2,1 \cdot 10^{-4}$ М; концентрация NAD — $2,78 \cdot 10^{-3}$ М, формата — 0,03 М); б — зависимость начальной скорости реакции от концентрации KNO_3 (концентрации NADH: 1 — 0; 2 — $1,4 \cdot 10^{-4}$ М; концентрация NAD — $2,78 \cdot 10^{-3}$ М, формата — 0,05 М)

миату согласуется с механизмом, включающим неупорядоченное присоединение субстратов с быстрым установлением равновесия между фермент-субстратными комплексами и образованием непродуктивных комплексов E-NADH и E-ХАПАД.

Однако в рамках данной схемы должно наблюдаться конкурентное ингибирование NADH и ХАПАД при варьировании концентрации NAD, в то время как согласно полученным результатам ингибирование в обоих случаях носит неконкурентный характер. Наиболее просто экспериментальные данные объясняются введением в рассматриваемую схему непродуктивных комплексов E-NAD-NADH или E-NAD-ХАПАД:

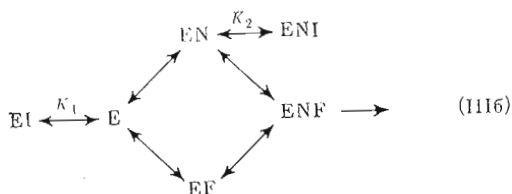


Схема III б описывается следующим кинетическим уравнением:

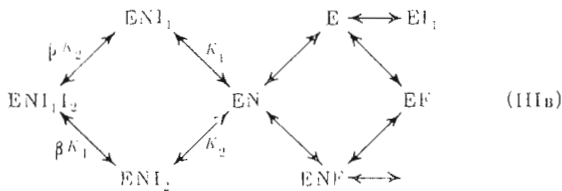
$$\frac{V}{v} = 1 + \frac{K_F}{[F]} \left(1 + \frac{[I]}{K_2} \right) + \frac{K_N}{[N]} + \frac{K_{NF}}{[N][F]} \left(1 + \frac{[I]}{K_1} \right). \quad (9)$$

Значения констант ингибирования формиатдегидрогеназы из *Bacterium* sp. 1, рассчитанные для неупорядоченного равновесного механизма (схема III б)

Ингибитор	$K_1=K_{E1, M}$	$K_2=K_{ENI, M}$
NADH	$(2,07 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$	$(3,4 \pm 1,8) \cdot 10^{-4}$
ХАПАД	$(2,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$	$(5,8 \pm 1,8) \cdot 10^{-4}$
Бикарбонат	$(0,11 \pm 0,02)$	$(0,14 \pm 0,02)$
Азид	—	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-7}$
Нитрат	—	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$
АМР	$(5,1 \pm 2,9) \cdot 10^{-3}$	$(8,0 \pm 2,5) \cdot 10^{-3}$
NADP	$(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$	$(4,4 \pm 1,0) \cdot 10^{-3}$

Рассчитанные на основании уравнения (9) константы ингибирования составили: $K_1 = (2,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$ М, $K_2 = (3,4 \pm 1,8) \cdot 10^{-4}$ М для NADH и $K_2 = (5,8 \pm 1,8) \cdot 10^{-4}$ М и $K_1 = (2,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$ М для ХАПАД (табл. 1).

Двухкомпонентное ингибирование. На рис. 7а, б приведены результаты, полученные при изучении двухкомпонентного ингибирования парами азид — NADH и нитрат — NADH. Кинетическая схема III с учетом образования возможных непродуктивных комплексов имеет вид:



где I_1 — NADH, I_2 — аналог формиата. При насыщающих концентрациях NAD кинетическая схема III в описывается уравнением

$$\frac{V}{v} = 1 + \frac{K_F}{[F]} \left(1 + \frac{[I_1]}{K_1} \right) + \frac{K_F [I_2]}{[F]} \left(\frac{1}{K_2} + \frac{[I_1]}{\beta K_1 K_2} \right). \quad (10)$$

Параллельность графиков зависимости величины обратной скорости реакции от концентрации одного из ингибиторов (азида или нитрата) в присутствии и в отсутствие NADH указывает на взаимозависимый характер ингибирования NADH и аналогами формиата — азидом и нитратом ($\beta = \infty$) [14]. Полученные результаты согласуются с конкурентным характером ингибирования NADH, наблюдаемым при варьировании формиата, и свидетельствуют о возможности существования тройного комплекса E-NAD-NADH.

Ингибирование АМР, АТР, NADP и NAD. Константы диссоциации комплексов АМР, АТР и NADP с ферментом существенно выше, чем соответствующие величины для NADH, ХАПАД и азида (табл. 1). При ненасыщающих концентрациях субстрата, концентрация которого была фиксирована, АМР и NADP выступают неконкурентными ингибиторами по отношению к NAD и конкурентными по отношению к формиату.

Зависимость тангенсов углов наклона графиков v^{-1} от $[F]^{-1}$ и $[N]^{-1}$ и величины отрезков, отсекаемых графиками на оси ординат, от концентрации АТР не линейна.

Увеличение концентрации NAD до 20 мМ уменьшает скорость ферментативной реакции. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации формиата при концентрациях NAD 20—30 мМ в координатах двойных обратных величин линейна (рис. 8). При увеличении концентрации кофермента до 40 мМ реакция полностью прекращается. Зависимость тан-

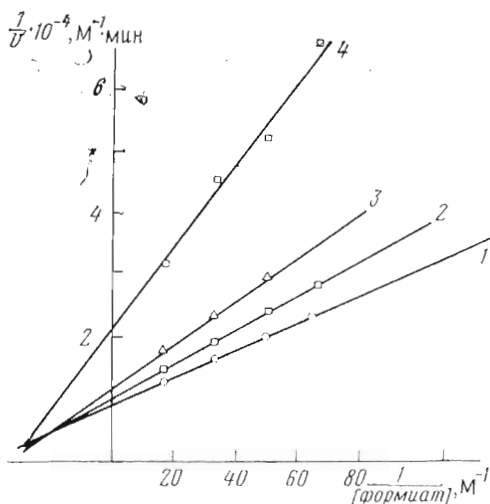


Рис. 8. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации формата в координатах Лайнуивера — Берка при концентрациях NAD, М: 1 — $2,1 \cdot 10^{-2}$; 2 — $2,53 \cdot 10^{-2}$; 3 — $2,95 \cdot 10^{-2}$; 4 — $3,37 \cdot 10^{-2}$

Формиатдегидрогеназа из *Bacterium* sp. 1 в концентрациях $3 \cdot 10^{-6}$ М не катализирует спектрофотометрически регистрируемого окисления NADH в присутствии 1 М бикарбоната. Согласно результатам Пикока и Боултера [7], скорость окисления NADH в присутствии формиатдегидрогеназы из *Phasoleus aureus* при использовании в качестве субстрата CO_2 в 20 раз превышала скорость реакции с бикарбонатом, но была в 2300 раз меньше величины скорости реакции окисления формата.

Учитывая высокие концентрации бикарбоната (до 0,3 М), необходимые для проявления эффекта ингибирования, нельзя исключить, что бикарбонат выступает в роли ингибитора, образующего непродуктивные комплексы как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратными комплексами.

Экспериментальные данные, полученные в результате кинетического анализа механизма действия формиатдегидрогеназы из *Bacterium* sp. 1, не согласуются с кинетическими схемами с последовательным присоединением субстратов. Результаты ингибирования NADH и аналогом NAD, а также аналогами формата могут быть объяснены в рамках механизма, в котором оба фермент-субстратных комплекса образуются в кинетически значимых количествах. Наиболее вероятна схема с быстрым установлением равновесия между всеми фермент-субстратными комплексами, но возможны и другие частные случаи общего механизма с неупорядоченным присоединением субстратов.

При интерпретации полученных данных в рамках разветвленной кинетической схемы с независимым присоединением субстратов наибольшие трудности возникают при объяснении характера ингибирования NADH и ХАПАД при варьировании концентрации NAD. Как правило, для NAD-зависимых дегидрогеназ NADH и аналоги NAD являются конкурентными ингибиторами по отношению к NAD, однако известны случаи, когда связывание восстановленной формы кофермента и второго субстрата взаимно исключают друг друга [15].

Формальное введение в схему тройного комплекса E-NAD-NADH позволяет объяснить наблюдаемые зависимости — конкурентное ингибирование по отношению к формату и неконкурентное по отношению к NAD.

Наши результаты существенно отличаются от результатов, полученных ранее Пикоком и Боултером [7] (табл. 2), а также Охиама и Ямаса-

генсов углов наклона графиков v^{-1} от $[F]^{-1}$, а также отрезков, отсекаемых этими графиками на оси ординат, от концентрации NAD не линейна.

Ингибирование высокими концентрациями NAD аналогично результатам, полученным при изучении ингибирования АТР. Нелинейный характер ингибирования данными соединениями указывает на то, что более чем одна молекула ингибитора связывается с одной и той же молекулой фермента.

Ингибирование бикарбонатом. Бикарбонат является смешанным неконкурентным ингибитором при ненасыщающих фиксированных концентрациях субстрата. При насыщающих концентрациях наблюдается конкурентное ингибирование как по отношению к формату, так и по отношению к NAD.

Характер ингибирования NAD-зависимых форматдегидрогеназ из *Phasoleus aureus*[7] и *Bacterium sp. 1* при ненасыщающих концентрациях второго субстрата

Ингибитор	Субстрат, концентрация которого варьируется	Характер ингибирования	
		<i>Phasoleus aureus</i>	<i>Bacterium sp. 1</i>
NADH	NAD	Конкурентный	Неконкурентный
»	Формиат	Неконкурентный	Конкурентный
Бикарбонат	NAD	Неконкурентный *	Неконкурентный
»	Формиат	Конкурентный *	»
Нитрат	NAD	Бесконкурентный *	Бесконкурентный
»	Формиат	Конкурентный *	Конкурентный
ADP-рибоза	NAD	Конкурентный	—
»	Формиат	Неконкурентный	—
ХАПАД	NAD	—	Неконкурентный
»	Формиат	—	Конкурентный

* Нелинейный характер.

ки [3] при изучении форматдегидрогеназы из высших растений. Дальнейшее уточнение кинетической схемы действия форматдегидрогеназы из *Bacterium sp. 1*, в частности установление порядка отщепления продуктов, затруднено ввиду отсутствия необходимой информации о природе второго продукта, а также практической необратимости реакции.

Ранее Като с соавт. [4] и Шютте с соавт. [5] при изучении NAD-зависимых форматдегидрогеназ из мезофильных дрожжей отмечали, что высокое значение констант Михаэлиса для формиата ($2,2 \cdot 10^{-2}$ М для фермента из *Kloeckera sp. 2* 201 [4] и $1,3 \cdot 10^{-2}$ М для фермента из *Candida boidinii* [5]), а также положение форматдегидрогеназы в цепи окисления C_1 -соединений могут обеспечивать необходимое для клетки направление протекания метаболизма мезофильных — при низких значениях концентрации формиата происходит преимущественное включение C_1 -соединений в процессы биосинтеза, а при высоких — окисление до CO_2 . С учетом наблюдаемого конкурентного ингибирования NADH по отношению к формиату данное предположение может быть сформулировано следующим образом: соотношение между скоростью окисления C_1 -соединений и CO_2 и их включения в процессы биосинтеза должно зависеть не только от концентрации формиата, но и от отношения концентраций формиата и NADH в клетке. Повышение концентрации NADH или понижение концентрации формиата должно приводить к уменьшению скорости окисления C_1 -соединений до CO_2 , а понижение уровня отношения концентраций NADH и формиата — к увеличению доли C_1 -соединений, окисляющихся до CO_2 . Данный механизм регуляции активности форматдегидрогеназы может играть существенную роль в регуляции метаболизма микроорганизмов, использующих метанол.

Неконкурентное ингибирование NADH по отношению к NAD может быть объяснено наличием в молекуле форматдегидрогеназы дополнительного NADH-связывающего центра. Полученных результатов недостаточно для постулирования такого центра, однако характер ингибирования АТР и высокими концентрациями NAD может служить дополнительным указанием на его существование.

Экспериментальная часть

Форматдегидрогеназа была выделена из бактерий (штамм *Bacterium sp. 1*), использующих метанол, фракционированием клеточных экстрактов сульфатом аммония и последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе

согласно методике, описанной ранее [1]. Чистота препаратов по данным электрофореза и аналитического ультрацентрифугирования составляла 90—95%. Фермент хранили при 4° в 0,03 М фосфатном буфере (рН 7,8) в присутствии 0,1 М меркаптоэтанола и 0,01 М EDTA. Непосредственно перед проведением экспериментов раствор фермента пропускали через колонку с акрилексом П-6 (Reanal, Венгрия), уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,0), и добавляли меркаптоэтанол в концентрации 0,1 М. NAD (Sigma, США, Grade III) был использован без предварительной очистки. Содержание энзиматически восстанавливаемого препарата составляло ~ 98%. NADH (Reanal, Венгрия) очищали ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0,03 М фосфатным буфером (рН 7,0). Элюцию NADH проводили 0,1 М фосфатным буфером. Отношение A_{340}/A_{260} для очищенного препарата NADH составляло 0,37. Аналог NAD — ХАПАД был получен из лаборатории биохимии Всесоюзного научно-исследовательского витаминного института. Свойства ХАПАД были описаны ранее в работе [16].

Активность форматдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности при 340 нм. Измерения проводили в анализаторе скоростей ферментативных реакций (модель 8600, ЛКВ, Швеция), конструкция которого предусматривает вывод цифрового значения начальной скорости на печать. Для определения скорости реакции в цилиндрическую кювету с оптической длиной пути 1 см добавляли буфер, растворы субстратов и фермента до общего объема 1 мл. Измерения проводили в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) при 37°. Реакцию инициировали введением одного из субстратов в кювету с помощью дозирующего микропипетора. Приводимые значения начальных скоростей реакции представляют собой среднеарифметическое 2—4 измерений. Результаты представляли в координатах Лайнуивера — Берка. Параметры прямых рассчитывали согласно [17] по методу наименьших квадратов с учетом статистических весов.

Авторы приносят глубокую благодарность сотрудникам ВНИВИ Н. И. Мальцеву и Е. А. Воронцову за предоставление аналога NAD, а также д-ру хим. наук К. Мартинеку и д-ру хим. наук Б. И. Курганову за полезное обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Захарова Е. В., Платоненкова Л. С., Егоров А. М., Березин И. В. (1977) Биохимия, 42, вып. 10, 1896—1904.
2. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Попов В. О. (1977) Биохимия, 42, вып. 11, 2020—2025.
3. Ohyama T., Yamazaki J. (1974) J. Biochem., 75, 1257—1263.
4. Kato N., Kano M., Tani Y., Ogato T. (1974) Agr. Biol. Chem., 38, 114—116.
5. Schütte H., Flossdorf J., Sahm H., Kula M.-R. (1976) Eur. J. Biochem., 62, 151—160.
6. Netrusov A. J., Rodionov Yu. V., Kondratjeva E. N. (1977) FEBS Lett., 76, 56—58.
7. Peacock D., Boulter D. (1970) Biochem. J., 120, 763—769.
8. Cleland W. W. (1963) Biochim. et biophys. acta, 67, 104—116.
9. Dalziel K. (1958) Trans. Faraday Soc., 54, 1247—1249.
10. Dalziel K., Dickinson F. M. (1966) Biochem. J., 100, 34—46.
11. Эммануэль Н. М., Кнорре Д. Г. (1962) Курс химической кинетики, «Высшая школа», М.
12. Cleland W. W. (1963) Biochim. et biophys. acta, 67, 173—187.
13. Theorell H., Chance B. (1951) Acta chem. scand., 5, 1127—1144.
14. Березин И. В., Клесов А. А. (1975) Практический курс ферментативной кинетики, с. 84—87, Изд-во МГУ.
15. Ehrlich R. S., Colman R. F. (1975) Biochemistry, 14, 5—11.
16. Воронцов Е. А., Мальцев Н. И., Щорс Е. И., Яковлев В. А., Глотов Б. О. (1974) Биофизика, 19, 626—632.
17. Wilkinson G. N. (1964) Biochem. J., 80, 324—333.

Получена в редакцию
4.VII.1977

**NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE FROM METHYLOTROPHIC
BACTERIA. A STUDY OF KINETIC MECHANISM**

POPOV V. O., RODIONOV Yu. V., EGOROV A. M., BEREZIN I. V.

*Department of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

A kinetic analysis of formate dehydrogenase (E. C. 1.2.1.2) from methanol utilizing bacteria (strain *Bacterium* sp1) has been carried out. According to experimental results the kinetic mechanism includes the formation of the ternary enzyme—NAD—substrate complex. The most likely pathway of reaction may consist in random binding of substrates and rapid equilibrium between all enzyme—substrate complexes.
