



УДК 577.158.429.02

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ГИДРИДНОГО ПЕРЕНОСА
NAD-ЗАВИСИМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Тышков В. И., Куликов И. С., Егоров А. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии и кафедры физической химии

Определена стереоспецифичность переноса гидрид-иона на NAD при окислении формиат-иона формиатдегидрогеназой метилотрофных бактерий *Achromobacter parvulus*. Показано, что формиатдегидрогеназа относится к NAD(P)-зависимым дегидрогеназам класса А и катализирует перенос гидрид-иона в (4-*про-R*)-положение никотинамидного кольца кофермента.

В плане систематических исследований структуры и механизма действия NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Achromobacter parvulus* (КФ 1.2.1.2, формиат: NaD⁺-оксидоредуктаза) нами изучены структура молекулы, основные физико-химические свойства [1], кинетическая схема реакции [2], выяснена роль SH-групп, остатков аргинина и гистидина активного центра в катализе и связывании субстратов [3–5].

Настоящая работа посвящена определению стереоспецифичности переноса гидрид-иона на NAD в реакции окисления формиат-иона, катализируемой формиатдегидрогеназой *A. parvulus*.

Известно, что при катализе реакций NAD(P)-зависимыми дегидрогеназами перенос гидрид-иона в 4-е положение никотинамидного кольца возможен как с А (4-*про-R*), так и с В (4-*про-S*)-стороны [6]. Стереоспецифичность гидридного переноса дегидрогеназ обусловлена строением их активного центра, поэтому знание стереоспецифичности необходимо для выяснения механизма действия фермента.

Большинство существующих методов определения стереоспецифичности гидридного переноса [7, 8] требует высокой частоты исследуемых веществ и занимает много времени. Использование ПМР-спектроскопии [9] позволяет избежать дополнительных стадий очистки, но метод по-прежнему остается трудоемким и требует больших количеств NAD. Применение масс-спектрометрии дает возможность не только избежать процедуры очистки анализируемых препаратов и сократить время анализа (не более 30 мин), но и повысить чувствительность по сравнению с ПМР не менее чем в 1000 раз [10].

В своих экспериментах по масс-спектрометрическому определению стереоспецифичности гидридного переноса глутаматдегидрогеназой *Lemna minor* Эмке и соавт. [10] использовали реакцию окисления NAD²H, для которого было известно положение атома дейтерия при 4-м атоме углерода никотинамидного кольца ([4S-²H]NADH). В случае формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий эта схема анализа не подходит, так как равновесие реакции окисления формиата до CO₂ при сопряженном восстановлении NAD до NADH практически сдвинуто в сторону образования продуктов. Поэтому нами была использована обратная схема: получение восстановленного кофермента с неизвестным положением атома дейтерия при 4-м углероде никотинамидного кольца ([4?-²H]NADH) при помощи формиатдегидрогеназы и его окисление дегидрогеназами с известной стереоспецифичностью — лактатдегидрогеназой сердца свиньи и глутаматдегидрогеназой печени быка (стереоспецифичности типа А и В соответственно). Поскольку исходные препараты дейтерированного формиата калия

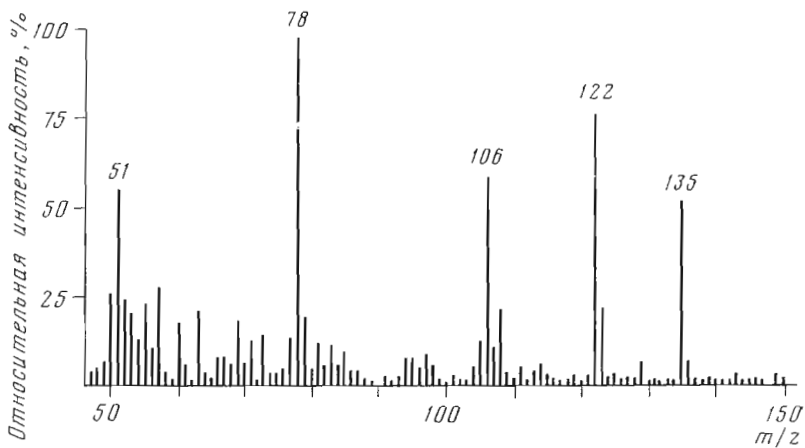


Рис. 1. Масс-спектр NAD, полученного окислением $[4\beta\text{-}^2\text{H}]\text{NADH}$ лактатдегидрогеназой сердца свиньи. Неочищенный образец

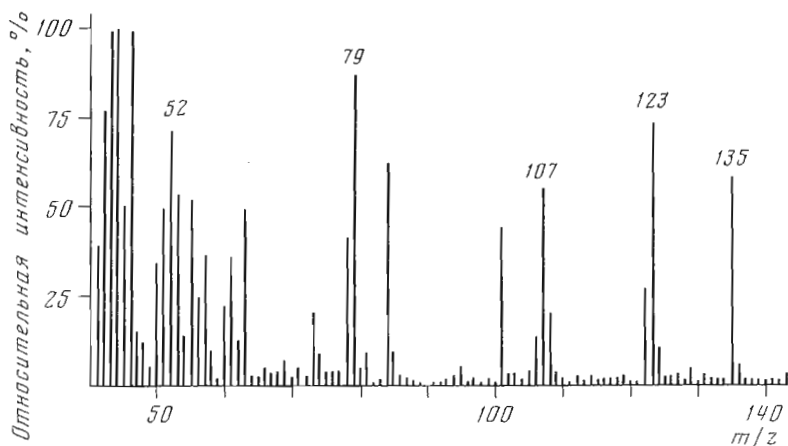


Рис. 2. Масс-спектр NAD, полученного окислением $[4\beta\text{-}^2\text{H}]\text{NADH}$ глутаматдегидрогеназой печени быка. Неочищенный образец

содержали 10% недеитерированного вещества, то для предотвращения увеличения содержания немеченого препарата в $[4\beta\text{-}^2\text{H}]\text{NADH}$ вследствие значительного кинетического изотопного эффекта форматдегидрогеназы (3,0) [2] реакцию окисления формата проводили в присутствии избытка NAD. После очистки от форматдегидрогеназы гель-хроматографией восстановленный кофермент с высокой степенью чистоты был выделен ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Полученный последующим окислением NAD анализировали без дополнительной очистки на содержание дейтерия при помощи масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом. Очевидно, что стереоспецифичность форматдегидрогеназы будет совпадать со стереоспецифичностью того фермента, который окисляет синтезированный $[4\beta\text{-}^2\text{H}]\text{NADH}$ с отщеплением атома дейтерия и образованием немеченого NAD.

Как было показано ранее [10], продукты пиролиза не меченого дейтерием NAD при 180–260°C дают в масс-спектрах при ионизации электронным ударом пики с m/z 51, 78, 106 и 122, а продукты пиролиза NAD с атомом дейтерия вместо водорода при 4-м атоме углерода — пики с m/z 52, 79, 107 и 123. Присутствие в смеси лактата и глутамата не влияет на результаты анализа, поскольку в масс-спектрах этих субстратов отсутствуют пики с указанным значением m/z [10]. Наличие пиков с m/z 51, 78, 106 и 122 в масс-спектре $[4\beta\text{-}^2\text{H}]\text{NADH}$, окисленного лактатдегид-

рогеназой (рис. 1), указывает на то, что в результате ферментативного окисления меченого восстановленного кофермента образовался немеченый NAD, т. е. лактатдегидрогеназа и формиатдегидрогеназа обладают одним и тем же типом стереоспецифичности гидридного переноса. Наличие пиков с m/z 52, 79, 107 и 123 в масс-спектрах $[4^2\text{-}^2\text{H}]$ NADH, окисленного глутаматдегидрогеназой (рис. 2), свидетельствует о том, что стереоспецифичность этого фермента отлична от стереоспецифичности формиатдегидрогеназы.

Таким образом, нами показано, что формиатдегидрогеназа мезофильных бактерий по своей стереоспецифичности относится к NAD(P)-зависимым дегидрогеназам класса А и катализирует перенос гидрид-иона в (4-*про*-R)-положение никотинамидного кольца кофермента.

Из полученных данных видно, что формиатдегидрогеназа с успехом может быть использована для получения $[4R\text{-}^2\text{H}]$ NADH. В существующем в настоящее время методе получения $[4R\text{-}^2\text{H}]$ NADH с помощью алкогольдегидрогеназы печени лошади [11] для сдвига равновесия в сторону образования продуктов в реакционную смесь вводят второй фермент — альдегиддегидрогеназу, отличающуюся низкой стабильностью. В предлагаемом варианте можно использовать продажный препарат $^2\text{HCOO}^2\text{H}$ (99,9% чистоты), а практическая необратимость окисления формиат-иона до CO_2 позволяет провести реакцию восстановления NAD на 100%. Полученный $[4R\text{-}^2\text{H}]$ NADH можно очистить при помощи ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (см. «Экспериментальную часть») или на макропористом сорбенте Bio-Rad AG MP-41 [11].

Экспериментальная часть

В работе использовали лактатдегидрогеназу сердца свиньи (КФ 1.2.1.22; Serva, ФРГ), глутаматдегидрогеназу печени быка (КФ 1.4.1.2; Ferak, Западный Берлин), NAD (Reanal, Венгрия), отечественные реактивы: щавелевую кислоту, пируват натрия, 2-оксоглутарат натрия и двузамещенный фосфат аммония (ч.д.а.).

Формиатдегидрогеназу выделяли из метанолиспользующих бактерий *A. parvulus*, как описано ранее [7]. Полученные препараты фермента были гомогенны, согласно данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

Меченный дейтерием формиат калия получали термическим разложением $[^2\text{H}]$ щавелевой кислоты при 170°C [12]. $[^2\text{H}]$ Щавелевую кислоту получали двукратной перекристаллизацией обычной безводной щавелевой кислоты из $^2\text{H}_2\text{O}$. Масс-спектрометрический анализ показал, что содержащее дейтерированного вещества в формиате калия составляет 90%.

Реакционная смесь восстановления содержала 14 ед. акт. * формиатдегидрогеназы, 50 мкмоль формиата калия и 75 мкмоль NAD в 5 мл 0,2 М фосфатного буфера. Ход реакции контролировали по поглощению при 340 нм. Смесь пропускали через колонку (1,5×60 см) с сефадексом G-50, уравновешенным 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5. Фракции, содержащие NAD ^2H , были собраны, разбавлены дистиллированной водой в 4 раза и нанесены на колонку (0,9×10 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5. Колонку промывали 150 мл того же буфера и восстановленный кофермент элюировали фосфатным буфером, pH 7,5, в линейном градиенте концентраций (0,01—0,2 М), регистрируя поглощение при 260 и 340 нм при помощи двухканального проточного спектрофотометра «Uvicord III» (LKB, Швеция). Полученный препарат NAD ^2H (выход 40 мкмоль, 80%) характеризовался отношением D_{260}/D_{310} , равным 2,30 (литературные данные [13] D_{260}/D_{240} 2,26).

При окислении $[4^2\text{-}^2\text{H}]$ NADH ферментами с известной стереоспецифичностью реакционные смеси содержали 5—7 ед. акт. фермента, 3 мкмоль $[4^2\text{-}^2\text{H}]$ NADH и 20 мкмоль пирувата натрия (окисление лактатдегидрогеназой) или 20 мкмоль 2-оксоглутарата натрия и 25 мкмоль двуза-

* 1 ед. соответствует количеству фермента, катализирующему превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

мещенного фосфата аммония (окисление глутаматдегидрогеназой) в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,5. После прекращения уменьшения поглощения при 340 нм смесь подкисляли азотной кислотой до рН 2,0 и лиофилизировали.

Масс-спектры были получены на масс-спектрометре MAT 212 (Varian) с энергией ионизирующих электронов 70 эВ, температурой ионизационной камеры 170° С, температурой образца 220° С. На один анализ требовалось менее 1 мкг неочищенного образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Egorov A. M., Avilova T. V., Dikov M. M., Popov V. O., Rodionov Yu. V., Berezin I. V. Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, № 3, p. 569-576.
2. Попов В. О., Егоров А. М., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1978, т. 240, № 1, с. 217-220.
3. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, № 7, с. 1212-1221.
4. Попов В. О., Егоров А. М. Биохимия, 1979, т. 44, № 2, с. 207-213.
5. Тишков В. И., Попов В. О., Егоров А. М. Биохимия, 1980, т. 45, № 2, с. 317-324.
6. Фёршт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 104, 105, 345-347.
7. Fisher H. F., Conn E. E., Vennesland B., Westmeimer F. H. J. Biol. Chem., 1955, v. 202, № 2, p. 687-698.
8. Jaraba J., Talalay P. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 6, p. 2147-2151.
9. Arnold L. J., You Kwan-Sa, Allison W. S., Kaplan N. O. Biochemistry, 1976, v. 15, № 18, p. 4844-4849.
10. Ehmke A., Flossdorf J., Habicht W., Schiebel H. M., Schulten R. Anal. Biochem., 1980, v. 101, p. 413-420.
11. Viola R. E., Cook P. F., Cleland W. W. Anal. Biochem., 1979, v. 96, p. 334-340.
12. Мэррей А. В кн.: Синтезы органических соединений с изотопами водорода. М.: Иностран. литература, 1961, с. 45-46.
13. Margolis S. A., Flowell B. F., Schaffner R. Clin. Chem., 1976, v. 22, № 2, p. 1322-1329.

Поступила в редакцию
26.VI.1981

HYDRIDE TRANSFER STEREOSPECIFICITY OF NAD-DEPENDENT BACTERIAL FORMATE DEHYDROGENASE

TISHKOV V. I., KULIKOV N. S., EGOROV A. M.
Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Stereospecificity of hydride transfer to NAD in formate oxidation by formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Achromobacter parvulus* has been determined. The experimental results show that the formate dehydrogenase is a NAD(P)-dependent dehydrogenase of type A and catalyzes hydride transfer onto (4-*pro-R*) position of the coenzyme nicotinamide moiety.