

УДК 577.152.3

# ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ТИАМИНАЗЫ I ИЗ *ANODONTA CYGNEA*

ПУЗАЧ С. С., ГОРБАЧ З. В., ОСТРОВСКИЙ Ю. М.

Описано выделение и изучены свойства тиаминазы I из внутренних органов двустворчатых моллюсков. Для получения фермента использовали экстрагирование 0,14 М NaCl, обработку 0,1 М ацетатным буфером, pH 5,0, фракционирование сульфатом аммония и хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. Достигнута очистка в 78 раз с 50%-ным выходом и удельной активностью 0,133 МЕ/мг белка. 0,14 М NaCl стабилизирует фермент, предохраняя его от инактивации в течение 2 недель. Методом стационарной кинетики и изотопного равновесия изучен кинетический механизм тиаминазной реакции и определена  $K_m$  тиамина (120 мкМ) и 2 значения  $K_m$  никотинамида: при низкой концентрации тиамина — 95 мМ, при высокой — 10 мМ. Молекулярная активность фермента при наличии косубстрата или в его отсутствие в реакционной среде, соответственно равны: 44 и 0,24 мин<sup>-1</sup>. Отмечено наличие «всплеска» скорости образования тиазола на первом этапе каталитического процесса в количестве, стехиометрическом концентрации фермента. Константы равновесия тиаминазной реакции с анилином и никотинамидом в качестве косубстратов равны 0,030 и 0,022 соответственно; стандартная свободная энергия процесса в направлении деградации тиамина ~9 кДж/моль.

Тиаминаза I (КФ 2.5.1.2) относительно широко распространена в природе [1, 2], что свидетельствует о существенной роли фермента в поддержании клеточного метаболизма. При парентеральном введении тиаминазы животным относительно быстро проявляются биохимические признаки, характерные для тиаминовой недостаточности [3, 4]. В этой связи изучение физико-химических, кинетических и регуляторных свойств тиаминазы приобретает особое значение в разработке вопросов направленной регуляции метаболизма с участием витамина B<sub>1</sub> и его производных. В широкой, хотя и мало изученной субстратной специфичности тиаминазы I заключена возможность достаточно сильного воздействия на функциональную активность тиаминзависимых систем клетки. Реализация этой возможности предполагает разработку доступных широкомасштабных методов получения фермента, а также изучение его важнейших физико-химических и кинетических характеристик.

В предлагаемой работе описан способ выделения высокоочищенной тиаминазы из внутренних органов пресноводных двустворчатых моллюсков (*Anodonta cygnea*) и дана оценка основных свойств фермента.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тиаминазу I выделяли из внутренних органов двустворчатых моллюсков гомогенизацией тканей (100 г) в физиологическом растворе, взятом 1:3 (вес/объем), продолжительность экстракции 30 мин. Повторная обработка в описанных условиях приводила к 25%-ному повышению выхода тиаминазы в растворимую фракцию. Дополнительное экстрагирование не давало эффекта. Объединенные надосадочные фракции, полученные после центрифугирования, подкисляли 1 М ацетатным буфером до pH 5,0 и выдерживали 30 мин, денатурированные белки удаляли центрифугированием (8000 g, 20 мин). В полученной надосадочной жидкости тестировалась практически вся тиаминазная активность. Для дальнейшей очистки фермента белок, осаждающийся при 40–70%-ном насыщении сульфата аммония, собирали центрифугированием (40 000 g, 30 мин) и диализовали против 10 мМ фосфатного буфера, pH 6,5, в течение 10 ч. Диализат наносили на колонку (15×5 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной буферным раствором, применявшимся для диализа. Несорбированные белки отмывали стартовым буфером. После отмывания колонки исходным буфером до нулевых значений поглощения белка (280 nm) проводили элюцию тиаминазы 0,3 М NaCl в стартовом буфере со скоростью 0,2 мл/мин. Фракции, обладающие активностью фермента, использовали для изучения ее свойств. Все этапы выделения фермента проводили при 0–4°.

Начальную скорость реакции, катализируемой тиаминазой, измеряли при 30° в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,5. Конечный объем проб для реакции 1 мл. Инкубационная среда содержала: 1188 мкМ [тиазол-2-<sup>14</sup>C]тиамин (удельная радиоактивность 0,05 мКи/ммоль) и 98 мМ никотинамид. [2-<sup>14</sup>C]тиазол, образованный в количествах, стехиометричных концентрации фермента, не включался в расчетное значение начальной скорости реакции. Другие условия проведенных кинетических измерений указаны в подписях к рисункам. О начальной скорости реакции, инициированной добавлением фермента, судили по образованию продукта реакции — [2-<sup>14</sup>C]тиазола [5].

Механизм тиаминазной реакции изучали методами стационарной кинетики и изотопного обмена в состоянии равновесия [6]. Наблюдения по кинетике изотопного обмена проводили с немеченым «тиазолом» (4-метил-5-(оксиэтил)-тиазол), полученным способом химической деградации тиаминна [5, 7].

Константу равновесия тиаминазной реакции определяли при широком варьировании концентрационных градиентов субстрата — тиаминна, косубстратов — сернокислоты анилина и никотинамида и рассчитывали по уравнению:  $K = ([T][MP]) / ([Th][Co])$ , где  $K$  — константа равновесия,  $T$  — тиазол,  $Th$  — тиамин,  $MP$  — модифицированный пиримидин,  $Co$  — косубстрат анилина или никотинамид — концентрации продуктов и субстратов реакции при установившемся равновесии.

Концентрацию тиаминна определяли тиохромным методом [8], тиазола — радиометрическим [5], модифицированного пиримидина и косубстрата — расчетным путем, так как количество расщепленного тиаминна (в молярном соотношении) соответствует количеству образованного производного витамина (MP, [9]).

В работе использовали: [тиазол-2-<sup>14</sup>C]тиамин (удельная радиоактивность 14,0 мКи/ммоль; «Amersham», Англия); витамин B<sub>1</sub> («Ferah», Зап. Берлин); никотинамид, *п*-аминобензойную кислоту (отечественного производства); витамин B<sub>6</sub> («Fluka», Швейцария); анилин сернокислый (отечественного производства); L-цистеин солянокислый («Chemapol», ЧССР); тиаминазу — частично очищенный препарат, выделенный из внутренних органов двустворчатых моллюсков (*Anodonta cygnea*), с удельной активностью 0,13 МЕ/мг белка.

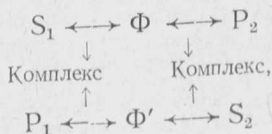
Радиометрические определения выполнены с диоксановым жидким сцинтиллятором в счетчике Mark II («Nuclear Chicago», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биологический материал, служивший источником фермента, хранили при —20° (6 месяцев). Ткань гомогенизировали (размельчитель тканей РТ-1, 7000 об/мин, 5 мин) в присутствии 0,14 М NaCl.

Данные по эффективности использованных стадий при очистке тиаминазы из внутренних органов двустворчатых моллюсков приведены в табл. 1.

Реакция, катализируемая тиаминазой, заключается в обратимой деградации тиаминна на пиримидиновый и тиазоловый компоненты и соответствует следующей кинетической модели [10]:



где  $S$  — субстрат,  $P$  — продукт,  $\Phi$  — фермент (свободная форма),  $\Phi'$  — замещенная форма фермента.

Зависимость скорости реакции от концентрации тиаминна или косубстрата имеет отклонения от гиперболической. Отличительная особенность реакции, катализируемой тиаминазой 1, заключается в наличии аномально высокой начальной скорости («всплеска») формирования первого продукта с последующей фазой стационарной кинетики. «Всплеск», соответствующий концентрации первого продукта, отмечается как в присутствии, так и в отсутствие косубстрата в реакционной среде (рис. 1, [11]).

Величина «всплеска» не зависит при указанных условиях определения от концентрации тиаминна (рис. 2) и находится, как установлено ранее [11], в прямой зависимости от концентрации фермента. Стационарная скорость тиаминазной реакции резко различается при использовании таких косубстратов, как *п*-аминобензойная кислота, никотинамид, цистеин, витамин B<sub>6</sub> и сернокислый анилин (рис. 1).

Соответствие кинетики тиаминазной реакции механизму двухтактно-го замещения установлено методом изотопного равновесия. Исключение

Стадии очистки	Объем, мл	Содержание белка, мг/мл	Общая активность	Удельная активность, ед. на 1 мг белка	Степень очистки	Суммарный выход
Исходный экстракт	230	60	24	0,0017	1	100
Подкисление 40%-ного насыщенного сульфата аммония	260	15	14,8	0,0038	2,24	62
Осаждение сульфатом аммония (40—0%-ного насыщения) и диализ	7	25	13,29	0,0700	41,2	54
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	180	0,5	11,96	0,133	78	50

косубстрата из реакционной среды не препятствовало изотопному обмену между нерадиоактивным тиазолом, присутствующим в реакционной среде и находящимся в равновесии с немеченым тиамином, и импульсно введенным [тиазол-2- $^{14}\text{C}$ ] тиамином. Обмен меткой характеризовался определенной скоростью, детальный анализ которой может дать информацию об индивидуальных константах скорости первой половины изучаемой реакции.

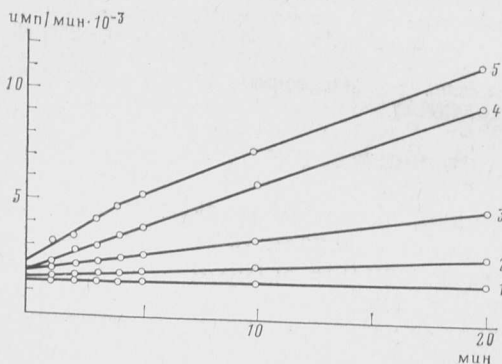


Рис. 1

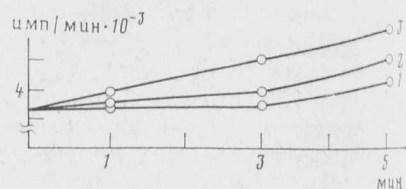


Рис. 2

Рис. 1. Влияние различных косубстратов, взятых в эквимольных концентрациях (5,2 мМ), на скорость ( $v$ ) тиаминазной реакции. Ось абсцисс — время; ось ординат — р/а продукта реакции [ $^{14}\text{C}$ ] тиазола; использованные косубстраты: 1 —  $n$ -аминобензойная кислота, 2 — L-цистеин, 3 — пиридоксальгидрохлорид, 4 — сернокислый анилин, 5 — никотинамид

Рис. 2. Величина амплитуды начального «всплеска» образования тиазола в тиаминазной реакции при различных концентрациях тиамина (1 — 37, 2 — 74, 3 — 148 мкМ) и фиксированной концентрации фермента (0,4 мкМ). Обозначения по оси абсцисс и ординат — см. рис. 1

Кинетический анализ, основанный на определении начальной скорости реакции при широком варьировании концентрацией субстратов, однозначно указывает на выполнимость для тиаминазной реакции кинетического механизма типа «пинг-понг». Графическое представление зависимости  $1/v$  —  $1/[\text{косубстрат}]$  при фиксированной концентрации субстрата имеет вид параллельных прямых (рис. 3б), что характерно для указанного второго кинетического механизма. Полученные из первичных зависимостей вторичные графики (рис. 3в) позволили определить  $K_m$  для тиамина и другие кинетические характеристики фермента (табл. 2). Анализ начальной скорости [12] полной тиаминазной реакции от концентрации тиамина указывает на отклонение от гиперболического закона (рис. 4).

При относительно низких концентрациях субстрата и фиксированной концентрации косубстрата скорость реакции явно устремлена к некоторому пределу, но не достигнув его, продолжает повышаться с повышением концентрации субстрата. Графики обратных зависимостей

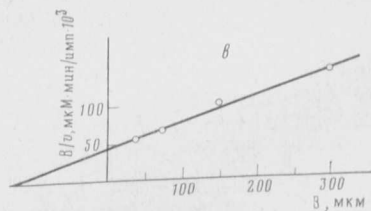
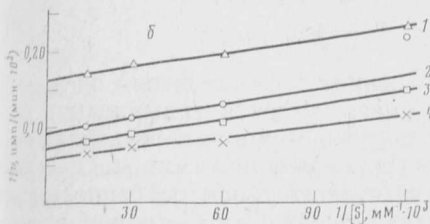
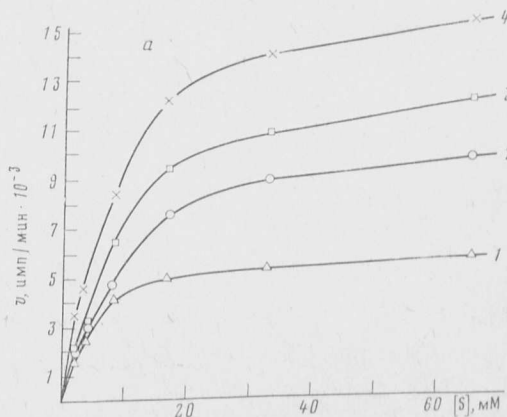
Некоторые кинетические характеристики тиаминазы I внутренних органов двусторчатых моллюсков ( $E_0=0,4$  мкМ, рассчитана из амплитуды всплеска)

Кинетический параметр	Значение
$K_m$ тиамина, мкМ	120
$K_m$ никотинамида, мМ:	
при низких концентрациях тиамина	95
при высоких концентрациях тиамина	10
$K_p$ , молекулярная активность, мин <sup>-1</sup> :	
в присутствии косубстрата анилина (5,2 мМ)	44
в отсутствие косубстрата анилина	0,24

(рис. 4б) имеют форму выпуклых кривых. Представление кинетических данных в координатах Хилла (рис. 5) указывает на отрицательную кооперативность по субстрату с величиной коэффициента Хилла, равной 0,7.

Особенность катализа тиаминазы, проявляющаяся в начальном «всплеске» образования тиазола, отмеченном отклонении протекания реакции от гиперболического закона предполагает дальнейшее изучение наблюдаемых явлений для формирования представления о механизме каталитического процесса.

Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой тиаминазой, от концентрации косубстрата (никотинамида) при фиксированной концентрации тиамина (а): [S] — концентрация никотинамида;  $v$  — количество продукта —  $[^{14}\text{C}]$  тиазола, сформированного за 5 мин течения реакции. Концентрация тиамина (мкМ): 1 — 37, 2 — 74, 3 — 148, 4 — 296. б — та же зависимость в координатах  $1/v - 1/[S]$ . в — вторичный график зависимости скорости реакции, катализируемой тиаминазой, в координатах  $B/v$  от  $[B]$  при низких концентрациях тиамина, где  $[B]$  — концентрация никотинамида



Полученные из первичных зависимостей вторичные графики, позволили определить два значения  $K_m$  по косубстрату: при низких концентрациях тиамина 95 мМ и при высоких — 10 мМ (табл. 2).

Существенным параметром, характеризующим тиаминазу I, является константа равновесия катализируемой ею реакции, равная 0,03 при использовании анилина и 0,022 — никотинамида в качестве косубстратов (табл. 3). Принятыми критериями достигнутого в реакции равновесия являлись: сохранение на длительном интервале времени установившихся градиентов концентрации субстратов и продуктов, отсутствие зависимости выхода продуктов реакции от концентрации фермента, ста-

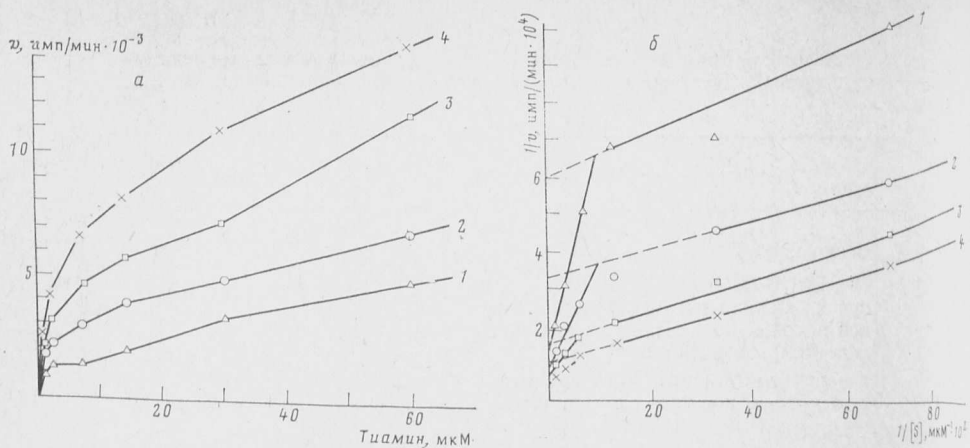


Рис. 4. Зависимость начальной скорости тиаминазной реакции от концентрации тиамин при фиксированной концентрации косубстрата (а).  $v$  — количество продукта— $^{14}\text{C}$ тиазола, сформированного за 5 мин течения реакции в указанных условиях, концентрация косубстрата (никотинамида), мМ: 1—4,1; 2—8,2; 3—16,4; 4—32,8. б — та же зависимость в координатах  $1/v - 1/[S]$

бильность частично очищенной тиаминазы на всем протяжении эксперимента.

Изменение стандартной свободной энергии изучаемой реакции, рассчитанное из соотношения  $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K$ , характеризуется положительной величиной и равно 9 кДж/моль. Замена анилина никотинамидом существенно не отразилась на константе равновесия. Исходя из полученных данных, можно заключить, что катализируемый тиаминазой I

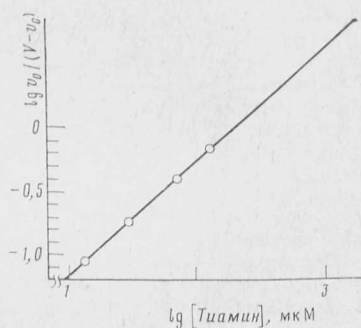


Рис. 5. Зависимость скорости тиаминазной реакции от концентрации тиамин в координатах  $\lg v_0 / (V - v_0) - \lg [S]$

процесс сдвинут в сторону синтеза тиамин. Становится очевидной проблематичность объяснения выраженного эффекта тиаминазы в развитии  $\text{B}_1$ -недостаточности у животных, получавших в виде инъекций очищенный фермент [3, 4]. Возможно, высокое авитаминозное действие тиаминазы в опытах *in vivo* связано с отличительной особенностью ее катализа на первой стадии процесса, заключающейся в высокой скорости деградации витамина, внутриклеточная концентрация которого в ткани животных чрезвычайно низка [13]. Вместе с тем, широкая косубстратная специфичность предполагает участие значительного числа промежуточных продуктов клетки в акцептировании трансформируемых тиаминазой групп.

Высокая эффективность фермента может быть связана также с активной элиминацией продуктов реакции из клетки, последующая экскреция которых будет направлять процесс в сторону преимущественной деградации витамина  $\text{B}_1$  и его фосфорилированных аналогов. Известна быстрая экскреция тиазола из тканей животных [14].

Установлено, что тиаминаза I мало чувствительна к протеолитиче-



Значение константы равновесия тиаминазной реакции при использовании анилина и никотинамида в качестве косубстрата

Субстраты и косубстраты, мкМ			Константа равновесия	Среднее значение
тиамин	анилин	никотинамид		
74	176	—	0,032	0,030
74	352	—	0,025	
74	1761	—	0,029	
74	3521	—	0,032	
74	3531	—	0,028	
148	—	4100	0,025	0,022
74	—	4100	0,022	
148	—	8200	0,019	

ской деградации, при которой образованные ферменты сохраняют значительную активность (данные не приведены). Отмеченный факт, несмотря на его потенциальную значимость, остается пока не использованным для объяснения специфических эффектов тиаминазы в опытах *in vivo*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Murata K. In: Review of Japanese Literature on Beriberi and Thiamine. Tokyo, 1965, p. 220—254.
2. Fujita A. J. Vitaminol., 1972, p. 18, p. 67—72.
3. Пузач С. С., Островский Ю. М. Вопр. мед. химии, 1979, т. 25, с. 137—144.
4. Пузач С. С., Островский Ю. М. Биохимия, 1980, т. 45, с. 2146—2152.
5. Edwin E. E., Jackman R. J. Sci. Food and Agric., 1974, v. 25, p. 357—368.
6. Уэстли Дж. В кн.: Ферментативный процесс. М.: Мир, 1972, с. 173—176.
7. Leichter J., Joslyn M. A. Biochem. J., 1969, v. 113, p. 611—615.
8. Leveille Gilbert A. Amer. J. Clin. Nutr., 1972, v. 25, p. 273—274.
9. Kennedy Ch. A., McCleary B. V. Analyst, 1981, v. 106, p. 344—351.
10. Фёршт Э. В кн.: Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 130—156.
11. Пузач С. С., Горбач З. В. Лаб. дело, 1982, № 9, с. 28—30.
12. Курганов Б. И. В кн.: Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978, с. 10—59.
13. Kazuhiko Ishii, Keisuke Sarai, Hiroshi Sanemori, Takashi Kawasaki. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1979, v. 25, p. 517—523.
14. Morey A. V., Juni Elliot. J. Biol. Chem., 1968, v. 234, p. 3009—3019.

Отдел регуляции обмена веществ  
АН БССР, Гродно

Поступила в редакцию  
16.XI.1983.

#### ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF THIAMINASE I FROM ANODONTA CYGNEA

PUZACH S. S., GORBACH Z. V., OSTROVSKY Yu. M.

Division of Metabolic Regulation, Byelorussian SSR Academy of Sciences, Grodno

Thiaminase I was isolated from internal organs of bivalve molluscs and characterized. The isolation procedure included extraction with 0.14 M NaCl, treatment with 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, fractionation by ammonium sulphate and DEAE-cellulose chromatography. The resulting enzyme preparation (78-fold purification, 50% yield) has specific activity of 0.133 ME/mg of protein. The enzyme is stabilized by 0.14 M NaCl which prevents it against inactivation within 2 weeks. Using steady-state kinetics and isotope equilibrium methods, the kinetic mechanism of the thiaminase reaction was studied and the  $K_m$  value for thiamine equal to 120  $\mu$ M and two  $K_m$  values for nicotinamide (95 and 10 mM for low and high thiamine concentrations, respectively) were determined. The enzyme turnover number in the presence and absence of the cosubstrate is 44 and 0.24  $\text{min}^{-1}$ , respectively. The «bursts» in the rate of thiazole synthesis at the first step of the catalytic reaction is observed at thiazole concentration stoichiometric to the enzyme concentration. The equilibrium constants for the thiaminase reaction with aniline and nicotinamide as cosubstrates are equal to 0.030 and 0.022, respectively. The standard free energy of the reaction proceeding in the direction of thiamine degradation is 9 kJ/mol.