

Р. М. АЗАРХ и В. Н. ГЛАДКОВА

ЦИСТЕИНДЕСУЛЬФИДРАЗА БАКТЕРИЙ И ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ — ПРОТЕИД ФОСФОПИРИДОКСАЛЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 IV 1952)

А. Е. Браунштейном и Р. М. Азарх (¹, ², ¹⁰) было установлено, что в печени В₆-авитаминозных крыс резко понижена активность фермента, отщепляющего сероводород от L-цистеина (цистеиндесульфгидразы). Попытки повысить активность фермента в экстрактах печени В₆-авитаминозных крыс добавлением фосфопиридоксаля (ФП) или других форм витамина В₆, однако, не давали постоянных результатов (²). В тех же условиях легко удается восстановить посредством ФП реакцию пересульфирования (³), осуществляемую ферментом, близко родственным десульфгидразе (⁴). Это расхождение побудило нас использовать для выяснения природы активной группировки десульфгидразы другой биологический объект, а именно, молочнокислые бактерии *Streptococcus fecalis*. Этот микроорганизм удается выращивать в отсутствие витамина В₆ на средах, содержащих D-аланин, который при этих условиях становится для *Str. fecalis* обязательным пищевым фактором (⁵⁻⁷).

Результаты наших опытов, изложенных ниже, показали наличие активной цистеиндесульфгидразы в полноценных, обеспеченных витамином В₆ клетках *Str. fecalis* и в полученных из них ферментных препаратах. Те же бактерии при росте на среде без витамина В₆ (с DL-аланином) лишены способности десульфировать L-цистеин. Однако в них присутствует апофермент десульфгидразы, который легко извлечь из бактерий, обезвоженных ацетоном или высушенных в вакууме и растертых. Во всех этих препаратах активность десульфгидразы восстанавливается при добавлении ФП. Заметная активность наблюдается уже с 0,1—0,2 γ Ва-соли ФП на 4 мл, а максимальная активность — с 1 γ ФП. В вытяжках из клеток, высушенных в вакууме (но не ацетоном), сохраняется ферментная система фосфорилирования; такие вытяжки активируются также кратковременным инкубированием с пиридоксалем (0,05—1,0 γ) в присутствии избытка аденозинтрифосфата (1,5 мг АТФ). Апофермент десульфгидразы удается получить из сухих полноценных клеток *Str. fecalis*, подвергая их экстракции, автолизу на холоду («старению») и диализу. Полученные слабо активные вытяжки при добавлении ФП значительно энергичнее десульфорируют цистеин.

Используя опыт, накопленный при работе с бактериями, мы обратились снова к десульфгидразе печени крыс. Как и прежде (²), не удалось активировать при помощи ФП вытяжки из печени В₆-авитаминозных животных. Однако мы смогли активировать добавлением ФП апофермент десульфгидразы в экстрактах печени нормальных крыс, инактивированных путем диализа против буфера с рН 4,0 (⁸). Описанную Бинкли (⁸) активацию десульфгидразы фолиевой кислотой мы не могли подтвердить ни с апоферментом печени (табл. 3), ни с бактериальным апоферментом (табл. 2, опыт № 12). Испытанные нами вытяжки печени крыс с выраженной алиментарной недостаточностью фолиевой

кислоты (12) имели нормальную десульфгидразную активность, которая не повышалась добавлением фолиевой кислоты.

Результаты наших опытов доказывают, что цистеиндесульфгидраза бактерий и животных тканей, наряду с ферментом пересульфирования (3) и рядом других ферментов аминокислотного обмена (10, 11), относится к числу протеидов фосфопиридоксала. Ссылаясь на нашу работу о роли витамина В₆ в действии десульфгидразы у животных, Каллио (9) сообщает, что добавление ФП активирует десульфирование цистеина и гомоцистеина в ферментных препаратах из *Proteus morgani*.

Экспериментальная часть

Полноценные культуры *Str. fecalis* выращивались на мясопептонной среде с дрожжевым экстрактом (среда № 1) или на синтетической среде с добавлением DL-аланина и пиридоксина (2 мг/л, среда № 2 (14)). Для выращивания В₆-дефицитных бактерий служила та же синтетическая среда, но без пиридоксина (среда № 3). После 24-часо-

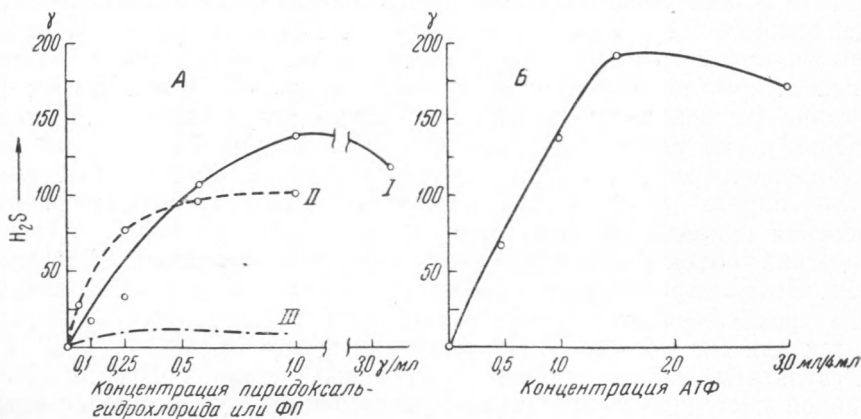


Рис. 1. Зависимость величин десульфирования цистеина в экстрактах высушенных В₆-дефицитных клеток *Str. fecalis* от концентрации ФП (А, кривая I), пиридоксала при избытке АТФ (А, кривая II) или одного пиридоксала (А, кривая III), а также от концентрации АТФ при избытке пиридоксала (Б)

вого роста при 37° бактериальные клетки собирали центрифугированием и промывали водой. В опытах применялись следующие типы ферментных препаратов:

Препарат А. Суспензия свежих отмытых бактерий (около 3 мг азота бактерий в 1 мл).

Препарат Б. Отмытые бактерии обезвоживали добавлением 10 объемов охлажденного до 0° ацетона, отсасывали, просушивали на воздухе и суспензировали в воде (30 мг сухих бактерий в 1 мл).

Препарат В. Отмытые бактерии, размозженные на часовом стекле, высушивали в вакууме над P₂O₅. Высушенные бактерии (30 мг на 1 мл воды) растирали 5 мин. при 0° с кварцевым песком.

Препарат Г. Суспензию ацетонированных полноценных клеток *Str. fecalis* (40 мг/мл в M/45 фосфатном буфере, pH 7,5) после 25-часового автолиза при 37° осветляли центрифугированием. Центрифугат выдерживали 14 дней при 1—3°, затем диализовали 20 час. против нескольких смен дистиллированной воды.

Постановка опытов. К 1 мл препарата (А—Г) добавляли 2 мл 0,1 M фосфатного буфера (pH 7,6), 6 мг L-цистеин-гидрохлорида (нейтрализованного) в 0,5 мл воды, 0,2 мл толуола и 0,05 мл октилового спирта. После 3 час. инкубации при 37° в атмосфере N₂ к пробам

добавляли без доступа воздуха 2 мл 20% трихлоруксусной кислоты и вытесняли H_2S током азота в поглотитель с раствором уксуснокислого цинка. Сероводород определялся фотометрированием метиленовой сини, образуемой в реакции с диметилпарафенилендиаминном и железом (13).

В табл. 1 приведены данные, характеризующие величину десульфгидразной активности полноценных клеток *Str. fecalis* и

практически полное исчезновение ее у B_6 -дефицитных бактерий.

В табл. 2 сведены результаты ряда опытов с активированием десульфгидразы в живых и сухих B_6 -дефицитных бактериях (А, В) и в вытяжках ацетонированных полноценных бактерий, полностью или

Таблица 1

Активность цистеиндесульфгидразы в суспензиях клеток *Str. fecalis* (образование H_2S в γ на всю пробу)

№№ пп.	Полноценные бактерии		№№ пп.	B_6 -дефицитные бактерии	
	Тип препарата	H_2S, γ		Тип препарата	H_2S, γ
1	А — суспензия свежих бактерий	195	40	А — суспензия свежих бактерий	22
2		144	11		0
3		285	12		0
4	В — ацетонированные бактерии	110	13	В — высушенные в вакууме бактерии	19
5		295	14		0
6		152	15		0
7		185	16		6
8		292	17		0
9		101			

Таблица 2

Активирование препаратами витамина B_6 десульфгидразы B_6 -дефицитных *Str. fecalis* и апофермента из полноценных бактерий

№№ опытов	Тип препарата	Контроль без добавл.	Пиридоксаль + гидрохлорид		Пиридоксаль + АТФ (1,5 мг)		Фосфопиридоксаль	
		образов. H_2S, γ	добавл. ко-фактор, γ	образов. H_2S, γ	добавл. ко-фактор, γ	образов. H_2S, γ	добавл. ко-фактор, γ	образов. H_2S, γ
1	А — суспензия свежих B_6 -дефицитных клеток	0	10	88	10	175	—	—
2	В — экстракт из B_6 -дефицитных сухих клеток	19	10	166	10	185	5	175
3		6	10	63	10	99	5	65
4		0	10	43	10	197	5	185
5		0	3	107	3	160	—	—
5		0	0,1	7	0,1	140	—	—
6		0	—	—	5	160	—	—
6		0	—	—	3	137	2	70
6		0	—	—	1	122	—	—
6		0	—	—	0,5	82	—	—
7		0	—	—	—	—	3	123
7		0	—	—	—	—	1	140
7		0	—	—	—	—	0,5	107
7		0	—	—	—	—	0,25	31
7		0	—	—	—	—	0,1	15
9		—	1	0	1	200	—	—
10	—	0,1	3	0,1	56	—	—	
10	—	0,05	0	0,05	36	—	—	
11	Г — экстракт из ацетонированных полноценных клеток, автолизированный и диализованный	106	—	—	—	2	220	
12		75*	85	—	—	2	150*; 162	
13		75	—	—	—	2	150	
14		2,5	—	—	—	5	40	
15		5	—	—	—	5	38	

* С добавлением 100 γ фолиевой кислоты.

частично освобожденных от кофермента (Г). Препараты типа Г активируются ФП, типа А и В — также пиридоксалем с АТФ (предварительная 10-минутная инкубация до добавления цистеина). При недостаточно тщательном растирании сухих бактерий (В, опыты №№ 2—5) и в жидких суспензиях для частичной активации достаточно предварительного инкубирования с одним пиридоксалем без АТФ. Добавление фолиевой кислоты (опыт № 12) не повышает активности десульфгидразы. На рис. 1 даны кривые, характеризующие зависимость величин десульфирования от концентрации ФП (Ва-соль) и пиридоксала с АТФ (рис. 1 А) и от концентрации АТФ при оптимальном содержании пиридоксала в пробах (рис. 1 Б). Абсолютные уровни этих кривых, полученных с разными бактериальными препаратами, несравнимы, но они показывают, что в данных условиях фосфорилирование пиридоксала протекает практически полностью, так как активность его не уступает активности эквимолекулярных концентраций нашего (не вполне чистого) препарата Ва-ФП. Кривая II (рис. 1 А) позволяет заключить, что концентрация половинного насыщения апофермента коферментом («константа сродства» к ФП)

Таблица 3

Влияние ФП и фолиевой кислоты на активность десульфгидразы в автолизированной и диализованной вытяжке из печени крысы (условия опыта см. (2))

№№ опытов	Без добавок, контроль	Фолиевая кислота (100 γ)	ФП (2 γ)	ФП (2 γ) и фолиевая кислота (100 γ)
	Образование H ₂ S в γ на всю пробу			
1	28	30	—	56
2	13	13	50	54
3	24,5	28	75; 70(5 γ ФП)	73

близка к $2,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л (для тирозин-декарбоксилазы — около $3 \cdot 10^{-7}$; см. (6)).

Данные по реактивированию фосфопиридоксалем инактивированных вытяжек из печени нормальных крыс приведены в табл. 3. Для этих опытов печень здоровой крысы (6 г) гомогенизировали 2 мин. в смесителе типа Уэринг с 0,9% раствором NaCl. Гомогенат прогревали 5 мин. при 55°, центрифугировали с охлаждением 30 мин. и центрифугат диализовали 48 час. при 0° против 0,01 М ацетатного буфера, рН 4,0 (8). Как показывает опыт № 3, для насыщения ферментной системы коэнзимом достаточно 2 γ ФП. В табл. 3 приведены также цифры, иллюстрирующие отсутствие активирующего влияния фолиевой кислоты.

Приносим искреннюю благодарность проф. А. Е. Браунштейну за руководство работой и проф. С. Р. Мардашеву, в лаборатории которого выращивались культуры предоставленного им штамма *Str. fecalis*.

Институт биологической и медицинской химии Академии медицинских наук СССР и Московский медицинский институт

Поступило 12 I 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Браунштейн, Доклад на II сессии Отд. мед.-биол. наук АМН СССР, Л., май 1949, Тезисы докладов, стр. 32. ² А. Е. Браунштейн и Р. М. Азарх, ДАН, 71, 93 (1950). ³ А. Е. Браунштейн и Е. Горяченкова, ДАН, 74, 529 (1950). ⁴ F. Binkley and D. Okeson, J. Biol. Chem., 182, 273 (1950). ⁵ E. Snell and B. Guirard, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 29, 66 (1943). ⁶ W. Umbreit and oth., Arch. Biochem., 7, 185 (1945). ⁷ H. Lichstein and oth., J. Biol. Chem., 157, 85 (1945). ⁸ F. Binkley, J. Am. Chem. Soc., 72, 2806 (1950). ⁹ R. Kallio, J. Biol. Chem., 192, 403 (1951). ¹⁰ А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949; Укр. биох. журн., 22, 273 (1950). ¹¹ W. Wood and J. Gunsalus, J. Biol. Chem., 190, 403 (1951). ¹² А. Е. Браунштейн и Г. Виленкина, ДАН, 80, 639 (1951). ¹³ J. Fogo and M. Porowsky, Analyt. Chem., 21, 732 (1949). ¹⁴ А. В. Труфанов, В. А. Кирсанова и З. И. Соловьева, Биохимия, 12, 482 (1947).