

УДК 577.156.7

БИОХИМИЯ

М. А. БЕЛОЗЕРСКИЙ, И. Б. ЕМЦЕВА, Т. А. КУРСАНОВА

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА ИЗ СЕМЯН ГРЕЧИХИ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 14 VI 1972)

С целью выяснения роли протеиназ в процессе прорастания мы приняли исследование по выделению и изучению свойств протеолитического фермента из семян гречихи. По нашим данным, протеолитические ферменты этих семян до сих пор не изучались. Был определен белковый состав семян гречихи (¹, ²) и было показано, что при прорастании один из главных компонентов этих белков — 13S-глобулин — распадается на субъединицы (³).

При разработке метода выделения в качестве субстрата использовали *n*-нитроанилид α ,N-бензоил *D,L*-аргинина (ВАРА). Для определения активности готовили 10^{-3} — 10^{-4} М раствор ВАРА в 0,5 М фосфатном буфере pH 7,5. К 2 мл раствора субстрата добавляли 0,1 мл раствора фермента, инкубировали при 37° и через определенные промежутки

Таблица 1

Характеристика отдельных стадий очистки фермента

Стадии очистки	Белок на 100 г ацетонного порошка (мг)	Общая активность на 100 г ацетонного порошка (ед. акт.)	Удельная активность (ед.мг)	Выход по активности (%)	Степень очистки
Экстракт	3320	20 900	6	100	0
Фракционирование ацетоном	408	10 000	24	48	4
Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50	50	5750	115	27	18
Хроматография на сефадексе Г-150	6,5	5200	800	25	125
Рехроматография на сефадексе Г-150	2,5	4000	1500	17	250

времени измеряли поглощение при 410 мμ. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое расщепляет 1 нмоль субстрата за 1 мин.

Концентрацию белка определяли по Лоури.

В окончательном варианте метод выделения состоит в следующем. Муку непроросших семян динлоидной гречихи (*Fagopyrum esculentum*, сорт «Большевик») промывали охлажденным до -20° ацетоном. Высушенный на воздухе ацетоновый порошок (400 г) экстрагировали 2 л 0,05 М фосфатного буфера pH 6,8 на холоду в течение ночи. Осадок отделяли центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляли охлажденный (-20°) ацетон до конечной концентрации 40% (по объему). Выпавший осадок отделяли центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляли густую водную суспензию ДЭАЭ-сефадекса А-50 (в количестве $\frac{1}{5}$ объема надосадочной жидкости). При этом происходила сорбция фермента на понообменнике. Последний промывали на воронке Бюхнера четырьмя порциями по 1 л 0,05 М фосфатного буфера pH 6,8,

содержащего увеличивающиеся концентрации NaCl (от 0,05 моля до 0,12 моля). Отмытый ионообменник переносили в колонку (45×3 см) и фермент элюировали 300 мл 0,3 *M* раствора NaCl в том же буфере. К элюату добавляли сухой сульфат аммония до 0,8 насыщения. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и растворяли в 10 мл указанного фосфатного буфера. Раствор диализовали против этого же буфера и затем наносили на колонку с сефадексом Г-150 (80×4 см). Элюцию вели 0,05 *M* фосфатным буфером pH 6,8 со скоростью 20 мл/час при 4°. Активную фракцию собирали и упаривали в мешочке для диализа, обдувая его вентилятором. Сконцентрированную фракцию рехроматографиро-

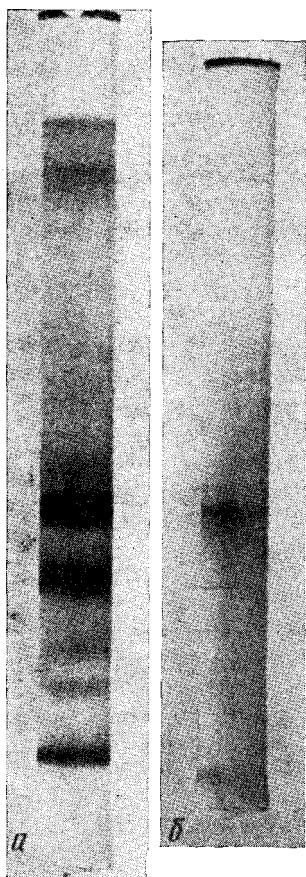


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле препарата фермента после хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе (а) и после рехроматографии на сефадексе Г-150 (б)

Рис. 2. Седиментационные диаграммы препарата фермента после рехроматографии на сефадексе Г-150. Скорость вращения ротора 56 100 об/мин., растворитель 0,05 *M* фосфатный буфер pH 6,8. Снимки сделаны через 35 мин. (а) и через 60 мин. (б) после достижения полной скорости

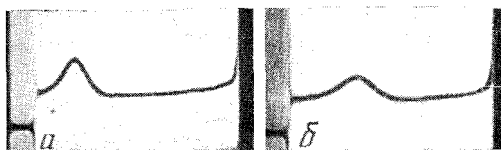


Рис. 1

Рис. 2

вали в тех же условиях на колонке сефадекса Г-150 (80×2 см). Сводные данные по очистке фермента приведены в табл. 1.

Полученный препарат фермента давал одну полосу при электрофорезе в полиакриламидном геле при pH 8,3 (4) и при седиментации давал один пик с коэффициентом седиментации 4,5 S (рис. 1 и 2). Судя по коэффициенту седиментации, фермент должен иметь молекулярный вес минимум около 70 000.

Выделенный фермент имел оптимум активности по ВАРА при pH 9. Он гидролизует этиловый эфир бензоил-*L*-аргинина (ВАЕЕ) и не расщеплял этиловый эфир бензоил-*L*-тирозина.

Для получения данных о характере активного центра выделенного фермента было проведено изучение действия на него различных ингиби-

торов и активаторов (табл. 2). Учитывая возможность присутствия в диизопропилфторфосфате примесей, действующих на SH-ферменты (⁵, ⁶), мы также использовали этот ингибитор в присутствии 0,05 М цистеина.

Из данных табл. 2 следует, что выделенный нами фермент не является SH-ферментом (небольшое снижение активности N-этилмалеинимидом может быть вызвано неспецифическим действием этого реагента). Обращает на себя внимание активация фермента *n*-хлормеркурибензо-

Таблица 2

Действие ингибиторов и активаторов

Реагента	Концентрация (мол.)	Активность по отношению к исходной (%)
<i>n</i> -Хлормеркурибензоат	10^{-3}	164
Хлористый натрий	0,17	100
N-Этилмалеинимид	10^{-3}	72
Цистеин + ЭДТА	$(5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2})$	100
ЭДТА	$3 \cdot 10^{-2}$	100
Диизопропилфторфосфат	10^{-4}	0
Диизопропилфторфосфат + цистеин	10^{-4}	0
N, α -тозил-L-лизилхлорметилкетон	10^{-4}	0
N, α -тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон	10^{-4}	100

атом, судя по всему, не вызванная активирующим действием ионов хлора. Причина этого явления не совсем понятна. Может быть, в этом случае имеют место конформационные изменения фермента или изменения четвертичной структуры, которые наблюдали ранее для других ферментов (⁷⁻⁹).

Полная инактивация фермента диизопропилфторфосфатом, гидролиз ВАРА и ВАЕЕ, ингибирование тозилхлорметилкетонем лизина позволяет думать, что выделенный нами фермент является сериновой протеиназой типа трипсина. Однако такое заключение не совсем согласуется с имеющимися данными о том, что аналогичные ферменты, расщепляющие ВАРА, из семян ячменя и сои не действуют на казеин, гемоглобин, лизоцим, цитохром с (¹⁰⁻¹²). Выказывалось мнение, что этот фермент является не протеиназой, а пептидазой (¹⁰). Но это маловероятно, если учесть, что в ВАРА нет свободных α -аминных и карбоксильных групп необходимых для проявления активности аминопептидаз и карбоксипептидаз.

С целью дальнейшего исследования субстратной специфичности выделенного фермента мы провели опыты по изучению его действия на казеин, суммарный препарат гистона из зубной железы телянка и протамин. Фермент добавляли к растворам этих белков (3 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5 в отношении 1:50 и инкубировали при 37°. Периодически отбирали пробы и определяли в них увеличение свободных аминных групп с помощью нингидриновой реакции. Полученные данные приведены в табл. 3.

Как следует из данных табл. 3, выделенный нами фермент, действительно, не действует на казеин, однако он заметно расщепляет препарат гистона и в еще большей степени протамин. Интересно, что при действии фермента на гистон через некоторое время инкубации происходит выпя-

Таблица 3

Гидролиз белков выделенным ферментом (микромоли аминных групп в 1 мл инкубационной смеси)

Субстрат	Время инкубации (часы)				
	0	2	4	6	20
Казеин	2,1	2,1	2,1	2,3	2,1
Гистон	1,1	2,1	2,6	2,6	3,5
Протамин	1,9	2,1	3,4	3,6	4,1

дение белка в осадок; подобное «створаживание» гистона наблюдали при гидролизе его трипсином (¹³, ¹⁴).

Таким образом, эти данные подтверждают заключение о том, что выделенный нами фермент, расщепляющий ВАРА, является сериновой протеиназой типа трипсина. Отсутствие гидролиза обычных белковых субстратов трипсина, по-видимому, свидетельствует об узкой субстратной специфичности выделенного фермента по отношению к белкам. Являются ли гистоны истинными субстратами этого фермента и какова его физиологическая функция — это должны показать дальнейшие исследования.

Выражаем благодарность проф. В. О. Шпикитеру за ценные советы.

Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. А. Белозерский, Л. Н. Викторова, В. О. Шпикитер, Биохимия, 33, 97, 1968. ² М. А. Белозерский, И. Б. Емцева, Биохимия, 35, 152, (1970). ³ М. А. Белозерский, ДАН, 199, 468 (1971). ⁴ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). ⁵ N. R. Gould, R. S. Wong, I. E. Liennner, Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 469 (1963). ⁶ N. R. Gould, I. E. Liennner, Biochemistry, 4, 90 (1965). ⁷ S. Rapoport, I. Luebering, J. Biol. Chem., 189, 683 (1951). ⁸ T. Cremona, J. Kowal, B. Z. Horecker, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 53, 1395 (1965). ⁹ J. C. Gerhart, A. B. Pardee, Federat. Proc., 23, 727 (1964). ¹⁰ W. C. Burger, N. Prentice et al., Phytochemistry, 7, 1261 (1968). ¹¹ M. Moeller, W. C. Burger, N. Prentice, Phytochemistry, 8, 2153 (1969). ¹² N. Catsimpoolas, S. K. Funk et al., J. Sci. Food and Agr., 22, 79 (1971). ¹³ C. F. Crampton, W. H. Stein, S. Moore, J. Biol. Chem., 225, 363 (1957). ¹⁴ D. M. P. Phillips, P. Simpson, Biochem. J., 82, 236 (1962).