

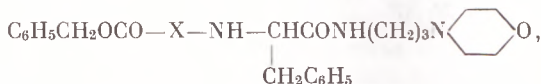
А. Г. ТИХОДЕЕВА, А. А. ЗИНЧЕНКО, Л. Д. РУМШ,
В. К. АНТОНОВ

НОВЫЕ СУБСТРАТЫ ПЕПСИНА

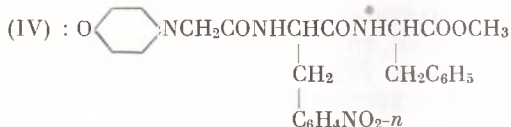
(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 9 VII 1973)

Исследование механизма катализируемого пепсином гидролиза пептидов осложняется отсутствием достаточно удобных для кинетических измерений субстратов. Обычно используемые дипептиды ароматических аминокислот гидролизуются пепсином свиньи очень медленно, обладают низкой растворимостью и требуют применения трудоемких методов кинетики (¹, ²). Наилучшими субстратами пепсина, несомненно, являются предложенные Фрутоном и сотрудниками (³) соединения — γ -пиридиловые эфиры пептидов, содержащих остаток *n*-нитрофенилаланина, например, ZGlyGlyPhe(NO₂)PheOR, где R — (CH₂)₃C₅H₅N. Однако и эти субстраты имеют невысокую растворимость в воде, что не дает возможности добиться в кинетическом опыте условия, когда концентрация субстрата [S]₀ приблизительно равна константе Михаэлиса (K_M).

С целью восполнить этот недостаток мы исследовали новый тип соединений — пептиды, содержащие морфолиновый остаток (I) — (III):



где (I) X=Phe; (II) X=*n*-(NO₂)Phe; (III) X=AlaAla(NO₂)Phe



Соединения I — III получали, исходя из γ -морфолинопропиламида фенилаланина, который был синтезирован конденсацией карбобензоксифенилаланина и γ -аминопропилморфолина в присутствии этилового эфира хлоругольной кислоты. Дальнейший синтез соединений I—III проводился обычными методами пептидной химии. Чистота полученных соединений проверялась хроматографически. Свойства полученных веществ приведены в табл. 1.

Как видно из приведенных данных, растворимость полученных соединений в воде при pH, близких к оптимальному для активности пепсина, достаточна для надежных кинетических измерений.

Скорость гидролиза соединения I измерялась методом с использованием тринитробензолсульфокислоты (⁴). Кинетика гидролиза соединений II — IV изучалась спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-4а, снабженном приставкой Гилфорда (⁵) и термостатированным кюветным отделением. Измерения проводились при λ 320 мμ. При этой длине волны разница в экстинкциях субстрата и продуктов ($\Delta\epsilon$) составляет 900 при pH 4,0.

Все измерения проводились при $37 \pm 0,5^\circ$, pH 4,0 в 0,1 M ацетатном буфере. Начальные скорости гидролиза измерялись по прямолинейному участку кривой, составляющему не более 20% полного гидролиза субстра-

та. Результаты измерений обрабатывались по методу Лайнуивера — Берка и обсчитывались на ЭВМ «Наири-2» с использованием метода наименьших квадратов. Полученные значения констант ферментативного гидролиза приведены в табл. 2, в которой для сравнения приведены и данные по гидролизу метилового эфира N-ацетилфенилаланилфенилаланина (V), взятые из работы (6).

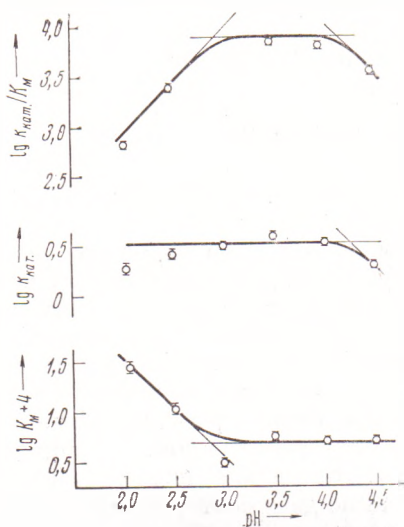


Рис. 1. Зависимость констант ферментативного гидролиза соединения II от pH. $[E]=4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} M$; $[S]=3 \cdot 10^{-4} - 1,5 \cdot 10^{-3} M$; 37°

Полученные нами результаты показывают, что введение γ -пропилморфолиновой группы существенно улучшает субстратные свойства дипептидов. Величина константы скорости второго порядка ($k_{кат}/K_M$) соединения I более чем на порядок превышает аналогичную константу соединения V. Эта разница обусловлена в основном увеличением $k_{кат}$, тогда как величина K_M изменяется мало. Отсюда можно заключить, что введение морфолиновой группировки способствует правильной ориентации расщепляемой связи субстрата, т. е. понижает степень непродуктивного связывания. Особенно резко степень непродуктивного связывания уменьшается в случае соединения III, константа каталитической скорости которого примерно в 10^4 раз больше, чем константа соединения V. Такое увеличение скорости гидролиза при введении в субстрат группировки Ala Ala согласуется с наблюдениями Фрутона и сотрудников (7).

Введение морфолиновой группы в N-концевой фрагмент дипептида (соединение IV) не только не повышает константу скорости гидролиза, но ухудшает константу Михаэлиса. Если учесть, что соединения, содержащие положительно заряженную группировку в N-концевом фрагменте субстрата, такие как, например, ZHis·Phe(NO₂)PheOMe (8) ($k_{кат}=17,4 \text{ мин}^{-1}$, $K_M=0,46 \text{ mM}$), являются достаточно хорошими субстратами пепсина, то

Таблица 1
Физико-химические свойства новых субстратов пепсина

Соединение	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{25^\circ}$ в ДМФ	R_f на Al_2O_3 (этилацетат)	Растворимость при pH 4,0, $M \cdot 10^3$
I	191—193	—23,1 $c = 0,63$	0,5	6
II	192—193	—16,8 $c = 3,0$	0,1	3
III	226—228	—17,7 $c = 0,3$	0,7	1
IV	117—119	—10,7 $c = 0,7$	0,35	3

результаты, полученные для соединения IV, показывают, что положение этого заряда в цепи должно быть строго фиксированным.

Способность γ -морфолинопропильной группы понижать степень непродуктивного связывания, по-видимому, обусловлена взаимодействием положительно заряженной группы этого остатка с какой-то анионной группой фермента. Для того чтобы проверить это предположение, мы изучили

pH-зависимость констант ферментативного гидролиза соединения II в области pH 2—4,5. Полученные данные представлены на рис. 1, из которого видно, что каталитическая константа $k_{\text{кат}}$ очень мало меняется в этом интервале pH. Что касается величины K_M , то она резко возрастает при pH < 3. Отсюда следует, что субстрат взаимодействует с группой фермента, имеющей $pK_a \sim 2,9$. Вероятно, такой группой является карбоксильная группа

Таблица 2

Константы ферментативного гидролиза соединений I—V pH 4,0;
0,1 M ацетатный буфер; 37° C

Соединение	[S] · 10 ³ , M	[E] · 10 ⁶ , M	$k_{\text{кат}}$, мин ⁻¹	$K_M \cdot 10^3$, M	$\frac{k_{\text{кат}} \cdot 10^{-3}}{K_M}$, M ⁻¹ · мин ⁻¹
I	4,0—0,7	5	2,83 ± 0,11	0,49 ± 0,05	5,69 ± 0,5
II	1,5—0,3	4	3,37 ± 0,17	0,52 ± 0,03	6,46 ± 0,3
III	0,6—0,2	0,02	2632 ± 79	1,51 ± 0,05	1739 ± 12
IV	1,5—0,3	10	0,49 ± 0,06	2,77 ± 0,36	0,18 ± 0,004
V			0,36 ⁽⁶⁾	1,1 ⁽⁶⁾	0,33 ⁽⁶⁾

* [E] — концентрация пепсина.

остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот. Следует отметить, что эта группа проявляется только в кинетике гидролиза субстратов рассматриваемого типа. Исследование pH-зависимости гидролиза пептидов, содержащих пропилпиридиновую группировку ⁽⁷⁾, не выявило зависимости K_M от pH в кислой области.

Хотя скорости гидролиза исследованных нами субстратов пепсина уступают скоростям гидролиза некоторых из полученных Фрутоном и сотрудниками ⁽⁷⁾ соединений, субстраты, содержащие морфолиновую группировку, выгодно отличаются от всех прочих своей растворимостью и могут с успехом быть использованы для подробного кинетического анализа реакций, катализируемых пепсином.

Институт химии природных соединений
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
5 VII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. J. Cornish-Bowden, J. R. Knowles, Biochem. J., 113, 353 (1969).
- ² K. Inouye, I. M. Voynick et al., Biochemistry, 5, 2473 (1966).
- ³ G. P. Sachdev, J. S. Fruton, Biochemistry, 8, 4231 (1969).
- ⁴ L. C. Mokrash, Anal. Biochem., 18, 64 (1967).
- ⁵ W. A. Wood, S. R. Gilford, Anal. Biochem., 2, 589 (1961).
- ⁶ G. E. Clement, S. L. Snyder et al., J. Am. Chem. Soc., 90, 5603 (1968).
- ⁷ G. P. Sachdev, J. S. Fruton, Biochemistry, 9, 4465 (1970).
- ⁸ K. Inouye, J. S. Fruton, Biochemistry, 6, 1765 (1967).