

Г. Ф. ДЕНИСОВА, О. Л. ПОЛЯНОВСКИЙ

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТ, СПЕЦИФИЧЕСКИ  
РАСЩЕПЛЯЮЩИЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ  
АСПАРТАТ-ТРАНСАМИНАЗУ ИЗ СЕРДЦА СВИНЬИ**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 28 VIII 1974)

Цитоплазматическая аспартат-трансаминаза (*L*-аспартат: 2-оксоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) из сердца свиньи состоит из нескольких субформ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ ), различающихся по своим каталитическим и спектральным свойствам (<sup>1, 2</sup>). Наивысшей активностью обладает  $\alpha$ -форма. Рядом автором (<sup>3, 4</sup>) было показано, что в процессе старения  $\alpha$ -формы образуется ряд других форм, обладающих большей электрофоретической подвижностью в геле. Предпринимая настоящее исследование, мы исходили из предположения о том, что образование новых форм может быть результатом протеолитического расщепления исходного фермента. Для некоторых ферментов, в частности для фосфофруктокиназы, было показано (<sup>5</sup>), что в очищенных препаратах фермента всегда присутствует примесь протеазы, которая не может быть удалена колоночной хроматографией. В других работах (<sup>6-8</sup>) описаны протеолитические ферменты, содержащиеся в различных тканях, специфически расщепляющие пиримидоксалевые ферменты. Анализируя препараты очищенной аспартат-трансаминазы, мы установили, что они содержат небольшую (2,5%) примесь протеазы, которая может быть отделена методом аффинной хроматографии или обработкой додецилсульфатом натрия.

При длительной инкубации аспартат-трансаминазы при pH 9,0 в 0,02 *M* аммоний-карбонатном буфере при 4° в присутствии толуола (для подавления роста бактерий) мы наблюдали постепенное накопление низкомолекулярной фракции, которую можно было удалить гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Аминокислотный состав этой фракции, определенный на анализаторе Bio-Cal 201, близок аминокислотному составу аспартат-трансаминазы. При хроматографии на бумаге в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (10:15:3—12) низкомолекулярная фракция разделялась на ряд пептидов, аминокислотный состав которых характеризует их как фрагменты молекулы аспартат-трансаминазы. Инкубация альбумина в аналогичных условиях не приводила к образованию низкомолекулярной фракции.

Мы предположили, что появление низкомолекулярной фракции может быть следствием протеолитического расщепления трансаминазы под действием протеазы, не отделяющейся от трансаминазы в процессе очистки фермента.

С целью проверки этого предположения была предпринята попытка освободиться от протеазы методом аффинной хроматографии. Считая, что протеаза обладает большим сродством к денатурированному белку, чем к нативному, была приготовлена активированная CNBr сефароза (<sup>9, 10</sup>), к которой затем ковалентно привязывали денатурированную аспартат-трансаминазу (сефароза-АТ). Сефарозу-АТ помещали в колонку (1×16 см), на которую наносили 3 мл раствора нативной аспартат-трансаминазы, содержащего 7 мг белка в 0,02 *M* аммоний-карбонатном буфере, и колонку медленно промывали тем же буфером. Фракцию, содержащую аспар-

тат-трансаминазу, анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата. В нативных высокоочищенных препаратах аспартат-трансаминазы мы всегда обнаруживали незначительную примесь белка, имеющего молекулярный вес  $\sim 23000-25000$  (рис. 1). После хроматографии на колонке с сефарозой-АТ этот белок в трансаминазе не обнаруживается, очевидно, вследствие образования на колонке комплекса с денатурированной аспартат-трансаминазой. Расщепление белка трансаминазы и образование пептидов в обработанной таким образом трансаминазе резко замедлялось (рис. 2). Полученный результат

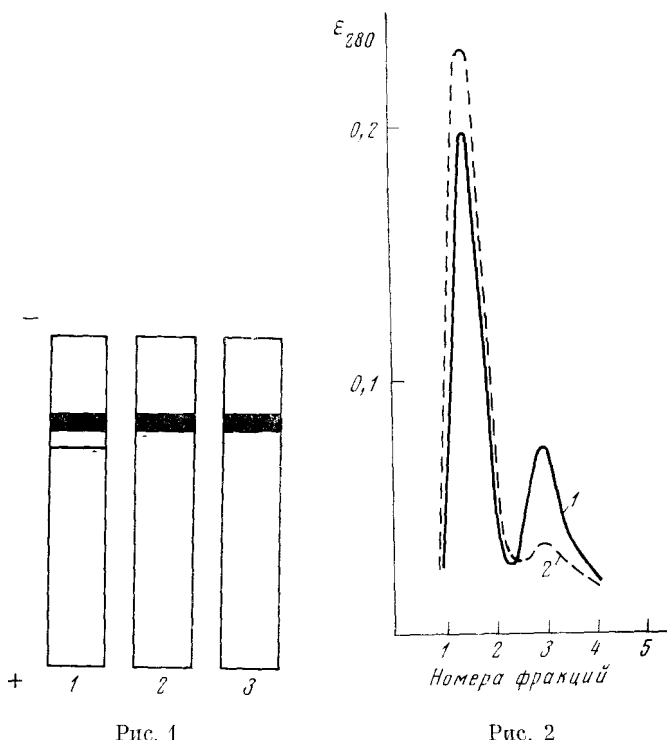


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Отделение протеазы от аспартат-трансаминазы. Электрофорез в трубочках с полиакриламидным гелем в присутствии додецилсульфата натрия (<sup>14</sup>). 1 — аспартат-трансаминаза; 2 — тот же препарат после хроматографии на сефарозе-АТ; 3 — аспартат-трансаминаза после гель-фильтрации на сефадексе G-100 в додецилсульфате натрия. На каждую трубочку наносили по 100 мкг аспартат-трансаминазы

Рис. 2. Гель-фильтрация аспартат-трансаминазы на сефадексе G-50 (fine). Растворы фермента (0,35 мг/мл) предварительно инкубировали 2 недели (рН 9,0; 37°), после чего 1 мл раствора наносили на колонку (1,2×10 см) и хроматографировали. 1 — аспартат-трансаминаза; 2 — тот же препарат после гель-фильтрации на сефарозе-АТ. Высокомолекулярный пик соответствует трансаминазе; низкомолекулярный пик соответствует фракции пептидов

подтверждал предположение о наличии протеазы, связанной с аспартат-трансаминазой. Отделение протеазы от аспартат-трансаминазы проводили также обработкой додецилсульфатом натрия с последующей гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной 0,1 M фосфатным буфером рН 7,2, содержащим 0,1% додецилсульфат натрия. При элюции колонки тем же буфером выходил пик белка аспартат-трансаминазы, которая не содержала примеси низкомолекулярного белка (электрофорез в 0,1% додецилсульфате натрия (рис. 1)). Вместе с тем после аспартат-трансаминазы с колонки вымывался пик белка с меньшим молекулярным весом. По соотношению площадей пиков трансаминазы и второго белка

было оценено содержание протеазы в препарате  $\alpha$ -формы аспаргат-трансаминазы. Оно составляет  $\sim 2,5\%$ . Препарат протеазы не обладал активностью, очевидно вследствие денатурации в присутствии додецилсульфата натрия.

Для получения обогащенного препарата активной протеазы использовали следующий метод. Аспаргат-трансаминазу денатурировали инкубацией при pH 12,3 15 мин. при комнатной температуре. Денатурированный белок переводили в 0,02 M аммоний-карбонатный буфер pH 9,0 гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (fine). Полученный таким образом препарат подвергался полному расщеплению в течение 1 недели при 37°. Этот факт свидетельствует о том, что денатурированный белок расщепляется с большей скоростью, чем нативный, и о том, что протеаза устойчива к действию щелочи. После завершения расщепления денатурированной аспаргат-трансаминазы низкомолекулярную фракцию удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, а белковую фракцию (считая, что она теперь является обогащенным препаратом протеазы) использовали при дальнейших исследованиях. Полученный таким образом препарат протеазы обладал активностью. Он, например, расщеплял аспаргат-трансаминазу, предварительно освобожденную от собственной протеазы в результате гель-фильтрации на сефадексе G-100 в присутствии додецилсульфата натрия.

Была определена зависимость активности протеазы от pH в интервале pH от 5,0 до 10,0. Оказалось, что с использованием денатурированной аспаргат-трансаминазы в качестве субстрата протеаза имеет четкий оптимум действия при pH 9,0.

Связанный с аспаргат-трансаминазой протеолитический фермент обладает весьма высокой специфичностью действия. Обогащенный препарат протеазы расщеплял глутамат-декарбоксилазу *Escherichia coli* (примерно с той же скоростью, что и  $\alpha$ -форму аспаргат-трансаминазы), но не действовал на цистеинилазу зародыша кур (оба фермента содержат в качестве кофермента пиридоксальфосфат). Протеаза не проявляла активности в отношении «непиридоксальных» белков (лактатдегидрогеназа, альбумин). Все исследованные субформы ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ) переваривались как «внутренней», так и добавленной извне обогащенной протеазой. Устойчивость к действию протеазы определяется несколькими факторами. Во-первых, скорость протеолиза зависит от денатурационной устойчивости: денатурированная трансаминаза переваривается значительно быстрее, чем нативная; наблюдается полное соответствие между тепловой денатурационной лабильностью различных субформ и скоростью их расщепления добавленной протеазой. Апофермент, имеющий большую денатурационную лабильность, чем холофермент, расщепляется значительно быстрее последнего. Во-вторых, быстрота переваривания зависит от pH, о чем упоминалось выше. Третье и, как мы считаем, наиболее существенное условие можно назвать концентрационным эффектом: скорость расщепления субформ трансаминазы «внутренней» протеазой повышается при уменьшении их концентрации в растворе. Зависимость степени расщепления (определяли как отношение поглощения при  $\lambda$  280 нм низкомолекулярной фракции, отделяемой при гель-фильтрации, к исходной концентрации трансаминазы) от концентрации белка различных субформ представлена на рис. 3. Можно видеть, что степень расщепления существенно возрастает по мере разведения растворов субформ. Концентрационную зависимость можно объяснить только диссоциацией компонентов системы. Поскольку известно, что аспаргат-трансаминаза в указанном интервале концентраций (от 0,1 мг/мл и выше) не диссоциирует на субъединицы, и пиридоксальфосфат также не диссоциирует, мы предположили, что концентрационный эффект объясняется диссоциацией комплекса аспаргат-трансаминаза — протеаза. Действительно, если принять, что содержание протеазы составляет 2,5% и комплекс трансаминаза — протеаза является бинарным, то экспериментальная кри-

вая переваривания  $\alpha$ -формы (рис. 3) совпадает с кривой диссоциации, имеющей  $K_{\text{дисс}}=4 \cdot 10^{-6}$ , а соответствующая кривая для  $\beta$ -формы соответствует кривой диссоциации с  $K_{\text{дисс}}=4 \cdot 10^{-6}$ , если считать, что содержание протеазы в ней в  $\sim 2$  раза меньше.

Мы считаем, что диссоциация комплекса трансаминаза — протеаза является основным условием для проявления протеолитической активности. Полученные результаты свидетельствуют, что действие протеазы, связанной с нативной трансаминазой, не проявляется или проявляется

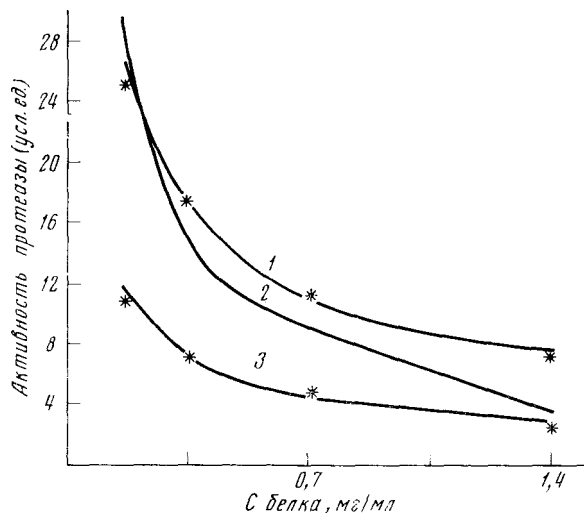
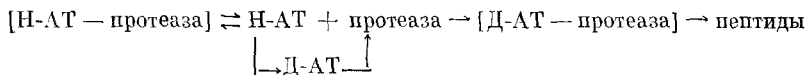


Рис. 3. Зависимость скорости переваривания различных субформ аспарат-трансаминазы «внутренней» протеазой от концентрации белка субформ в растворе. Протеолитическую активность, найденную экспериментально, приводили к активности протеазы, определяемой при концентрации трансаминазы 1 мг/мл. Звездочки — точки кривых диссоциации, полученные расчетным путем, принимая значение константы диссоциации  $4 \cdot 10^{-6}$ . 1 —  $\alpha$ -форма, 2 —  $\gamma$ -форма, 3 —  $\beta$ -форма.

крайне медленно. Это видно по тому, что даже длительное хранение относительно концентрированных растворов ( $>3$  мг/мл) не ведет к заметному появлению низкомолекулярной фракции. Свободная протеаза, образовавшаяся в результате диссоциации комплекса, находит в растворе молекулы денатурированной трансаминазы (Д-АТ) и расщепляет их либо снова связывается в неактивный комплекс с нативной трансаминазой (Н-АТ):



Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
12 VIII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. Martinez-Carrion, D. C. Tiemeier, D. L. Peterson, *Biochemistry*, v. 9, 2574 (1970).
- <sup>2</sup> M. Martinez-Carrion, F. Riva et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 20, 206 (1965).
- <sup>3</sup> B. E. C. Banks, S. Doonan et al., *Europ. J. Biochem.*, v. 5, 528 (1968).
- <sup>4</sup> M. Arrio-Dupont, J. Cournil, P. Duie, *FEBS Letters*, v. 11, 144 (1970).
- <sup>5</sup> W. Diezel, K. Nissler et al., *FEBS Letters*, v. 27 (1972).
- <sup>6</sup> E. Kominami, K. Kobayashi et al., *J. Biol. Chem.*, v. 247, 6848 (1972).
- <sup>7</sup> N. Katunuma, T. Katsunuma et al., *Adv. in Enzyme Regulation*, v. 11, 37 (1973).
- <sup>8</sup> H. Holzer, T. Katsunuma et al., *ibid.*, v. 11, 53 (1973).
- <sup>9</sup> P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, v. 245, 3057 (1970).
- <sup>10</sup> S. Fukui, S. Ikeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 52, 482 (1973).
- <sup>11</sup> A. L. Shapiro, E. Venuela, J. V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 28, 815 (1967).