Доклады Академии наук СССР
1976. Том 229, № 2

УДК 577.156.7

БИОХИМИЯ

Я. Е. ДУНАЕВСКИЙ, М. А. БЕЛОЗЕРСКИЙ

ОБ ЭНДОПЕПТИДАЗНОЙ ПРИРОДЕ ТРИПСИНОПОДОБНОГО ФЕРМЕНТА ИЗ СЕМЯН РЖИ

(Представлено академиком А. С. Спириным 12 III 1976)

Ранее было показано, что в семенах ржи имеется трипсиноподобный фермент, расщепляющий синтетический субстрат *n*-нитроанилид N_α-бензоил-*DL*-аргинина (БАПА) ([1]). Такого рода ферменты были обнаружены в семенах многих растений и изучению их свойств посвящен ряд работ ([2–9]). Эти ферменты часто условно называются БАПАазами. Было показано, что БАПАазы не расщепляют заметно казеин, гемоглобин, сывороточный альбумин, лизоцим и т. д. ([2, 6, 8, 9]). С другой стороны, некоторые препараты БАПАаз гидролизовали небольшие пептиды, и на основании этого было сделано заключение, что БАПАазы представляют собой не протеиназы, а пептидазы ([5, 9]). Это заключение не согласуется с тем, что БАПАазы расщепляют не характерный для пептидаз, защищенный с двух сторон субстрат (БАПА). Выяснение вопроса о том, является ли БАПАаза пептидазой или протеиназой, имеет важное значение для понимания физиологической роли этого фермента. Для уточнения субстратной специфичности БАПАаз и было предпринято настоящее исследование.

Фермент получали из семян ржи (сорт Гибридная-2) по методу, описанному ранее ([10]). Метод выделения включает экстракцию водой муки непроросших семян ржи, фракционирование полученного экстракта с помощью хроматографии на сефадексе ДЭАЭ А-50, осаждение сульфатом аммония, гель-хроматографию на сефадексе G-75 и препаративный электрофорез в блоке полиакриламидного геля. Чистота полученного фермента была подтверждена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, аналитического ультрацентрифугирования и изоэлектрического фокусирования. Препарат фермента не расщеплял *L*-лейцил-β-нафтиламид, гиппуровую кислоту, гиппурил-*L*-аргинин, гиппурил-*L*-лизин, что свидетельствует об отсутствии в нем заметных примесей аминопептидазной и карбоксипептидазной активностей. Концентрацию фермента в растворе определяли по методу Лоури. Активность фермента определяли спектрофотометрически по расщеплению синтетического субстрата N_α-бензоил-*DL*-аргинил-п-нитроанилида ([10]).

Как было показано ранее, БАПАаза семян ржи расщепляет аргининбогатые белки — протамины ([10]). Поэтому эти белки и были использованы в данной работе для выяснения субстратной специфичности фермента. Одновременно была использована окисленная В-цепь инсулина, как классический субстрат для решения вопросов такого рода. В качестве протаминов были взяты сальмин («Calbiochem») и стурин В*; окисленную В-цепь инсулина получали из бычьего инсулина по стандартной методике ([11]). Чистота белковых субстратов во всех случаях контролировалась с помощью N-концевого анализа. Все эти субстраты имеют известную первичную структуру, что дает возможность определять места расщепляемых пептидных связей с помощью методов N-концевого анализа белков.

* Препарат стурина В, выделенный из молок осетра, был любезно предоставлен Е. П. Юликовой.

В данном случае анализ продуктов расщепления белковых субстратов проводили с помощью метода дансилирования ([12]). Для проведения ферментативного гидролиза к 0,5 мг субстрата в 0,5 мл 0,05 *М* фосфатного буфера pH 7,6 добавляли 20 мкг фермента в 0,1 мл того же буфера и инкубировали смесь в течение 16 час. при 37°. Одновременно проводили контрольные опыты, где в одном случае инкубировали только один фермент, а в другом — один субстрат. Затем к смеси добавляли 0,2 мл 0,5-процентного раствора дансилхлорида в ацетоне и инкубировали смесь в течение 1 часа при 37°. После инкубации смесь упаривали досуха на роторном испарителе, к сухому остатку добавляли 0,1 мл раствора 5,6 *N* HCl и вели гидролиз в вакууме при 105° в течение 20 час. Гидролизат упаривали, промывали дистиллированной водой до полного удаления HCl и дансильные производные аминокислот экстрагировали ацетоном с незначительным количеством аммиака. Полученные таким образом дансильные производные аминокислот подвергали двумерной хроматографии в тонком слое на пластинках с силикагелем (к силикагелю добавлялся гипс в весовом соотношении 20:1). Для разделения дансильных производных аминокислот были использованы три системы растворителей. Система I: ацетон — изопропанол — аммиак (9,0 : 7,0 : 0,5), система II: хлороформ — бензиловый спирт — этилацетат — ледяная уксусная кислота (9,0:6,0:7,5:0,5) и система III: хлороформ — бензиловый спирт — метанол — уксусная кислота (10,0:8,0:2,0:2,0 по объему). После хроматографии положение дансильных производных аминокислот на пластинках устанавливали по их флуоресценции в ультрафиолете. Флуоресцирующие пятна дансиламинокислот идентифицировали с помощью стандартных дансиламинокислот.

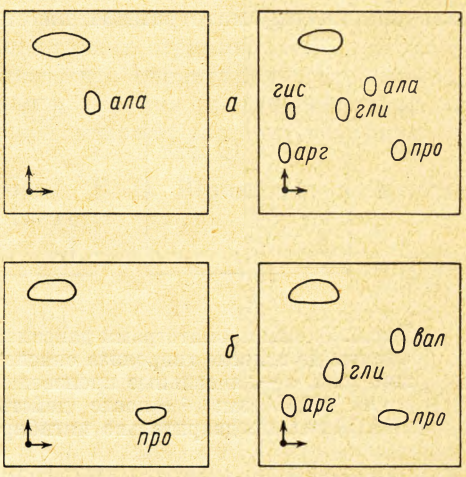


Рис. 1. Схемы хроматограмм дансильных производных аминокислот, полученных до и после гидролиза стурина В (*а*) и сальмина (*б*) БАПАазой семян ржи. Слева — дансильные производные аминокислот, полученные до действия БАПАазы, справа — после действия БАПАазы

Как видно (рис. 1*а*), после расщепления БАПАазой стурина В на хроматограммах, кроме дансил-производного N-концевого аланина, были обнаружены также дансильные производные аргинина, глицерина, пролина и гистидина. Первичная структура стурина имеет следующий вид ([13]):

ала—арг—арг—арг—арг—арг—сер—сер—арг—про—гли—арг—арг—арг—
арг—арг—арг—арг—гис—гли—арг—арг—арг—арг—гли—арг—арг.

Сопоставление этих N-концевых аминокислот, образовавшихся после расщепления стурина БАПАазой, с первичной структурой стурина указывает на то, что эти аминокислоты могли быть обнаружены, по-видимому, после расщепления пептидных связей, образованных карбоксильной группой аргинина. Сходные данные были получены и при расщеплении БАПАазой сальмина (рис. 1*б*), имеющего следующую первичную структуру ([14]):

про—арг—арг—арг—арг—сер—сер—сер—арг—про—вал—арг—арг—арг—арг—арг—
про—арг—вал—сер—арг—арг—арг—арг—арг—арг—гли—гли—арг—арг—арг—арг.

Эти результаты находятся в хорошем соответствии с данными, полученными ранее на синтетических субстратах ([10]), где показано, что БАПАаза

гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильной группой аргинина.

Появление на хроматограммах дансильных производных аргинина, гистидина, глицина и пролина после обработки стурина В БАПАазой при отсутствии дансильного производного глутаминовой кислоты исключают возможность наличия у фермента карбоксипептидазной активности. В случае сальмина наличие такой активности у БАПАазы исключается, так как появление на хроматограммах пятен дансил-валина в отсутствие дансил-

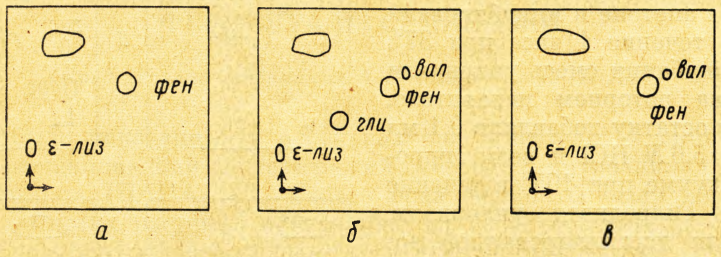


Рис. 2. Схемы хроматограмм дансильных производных аминокислот, полученных до и после гидролиза окисленной В-цепи инсулина БАПАазой семян ржи. *а* – дансильные производные аминокислот, полученные до действия БАПАазы; *б* – после действия БАПАазы; *в* – после действия БАПАазы, предварительно ингибированной диизопропилфторфосфатом

серина не может произойти за счет такой экзопептидазной активности. Аминопептидазная активность БАПАазы в обоих случаях исключается ввиду отсутствия на хроматограммах пятен дансил-серина. Таким образом, эти данные свидетельствуют об эндопептидазной активности БАПАазы семян ржи.

Такое заключение подтверждается и опытами по гидролизу БАПАазой окисленной В-цепи инсулина. При расщеплении БАПАазой этого субстрата на двумерных хроматограммах дополнительно к дансильным производным ε-лизина и N-концевого фенилаланина были обнаружены дансильные производные глицина и, в небольшом количестве, валина (рис. 2). Предварительная обработка фермента диизопропилфторфосфатом в концентрации, полностью ингибирующей активность БАПАазы, приводила к полному исчезновению на хроматограмме пятна дансил-глицина, при сохранении следов дансил-валина (рис. 2*в*). Присутствие на хроматограммах пятна дансил-глицина может быть связано с расщеплением любой из трех пептидных связей (цис — гли, цис — гли, арг — гли), в образовании которых принимает участие аминогруппа глицина, находящегося в положениях 8, 20 и 23 В-цепи инсулина, первичная структура которой имеет следующий вид ([11]):

5 10 15
фен—вал—асн—глн—гис—лей—цис—гли—сер—гис—лей—вал—глу—ала—лей—тир—лей—вал—
20 25 30
цис—гли—глу—арг—гли—фен—фен—тир—тре—про—лиз—ала.

Сопоставляя эти данные с данными по расщеплению стурина В и сальмина, а также с данными по расщеплению синтетических субстратов ([10]), можно предполагать, что при действии БАПАазы на окисленную В-цепь инсулина происходит расщепление внутренней связи арг — гли. Обнаруживаемое на хроматограмме слабое пятно дансил-валина, по-видимому, связано с присутствием в препарате БАПАазы незначительной примеси другого протеолитического фермента, не выявляемого при анализе гомогенности БАПАазы. Однако освобождение N-концевого глицина при действии БАПАазы не могло произойти за счет экзопептидазного действия (например, аминопептидазы), так как, кроме пятен дансил-глицина и дансил-валина, пятен дансил-производных других аминокислот на хроматограммах обнаружено не было.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что БАПАаза из семян ржи является протеиназой, а не пептидазой. Как уже отмечалось, БАПАаза не гидролизует многие белковые субстраты; она не гидролизует и белковые фракции семян ржи ([10]). Это, возможно, указывает на то, что БАПАаза является протеиназой с узкой субстратной специфичностью и, может быть, имеет свой специфический субстрат. Таким субстратом мог бы быть, например, аргининбогатый белок, обнаруженный гистохимически в семенах ряда растений ([15]). С другой стороны, нельзя исключить, что БАПАаза осуществляет ограниченный протеолиз одной-двух характерных связей в белках, что очень трудно обнаружить обычными методами, применяемыми для измерения протеолитической активности. В этом ограниченном протеолизе и может заключаться физиологическая роль этого фермента.

Авторы выражают благодарность проф. В. О. Шпикитеру за ценные советы и интерес к работе.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
13 II 1976

ЛИТЕРАТУРА

[1] *Я. Е. Дунаевский, М. А. Белозерский,* Вестн. Московск. ун-та, сер. биол., № 1, 81 (1974). [2] *G. Graf, R. E. Hoagland,* Phytochemistry, v. 8, 827 (1969). [3] *L. Beevers,* Phytochemistry, v. 7, 1837 (1968). [4] *A. Pusztai, J. Duncan,* Planta, v. 96, 317 (1971). [5] *E. C. Cameron, M. Mazelis,* Plant Physiol., v. 48, 278 (1971). [6] *J. E. Kruger,* Cereal Chem., v. 48, 512 (1971). [7] *М. А. Белозерский, И. Б. Емцева, Т. А. Курсанова,* ДАН, т. 209, 1215 (1973). [8] *Е. И. Земчик, А. Д. Шутов, И. А. Вайнтрауб,* Биохимия, т. 38, 964 (1973). [9] *W. C. Burger, N. Prentice et al.,* Phytochemistry, v. 7, 1261 (1968). [10] *Я. Е. Дунаевский, В. Н. Команцев, М. А. Белозерский,* Биоорган. хим., т. 2, 221 (1976). [11] *F. Sanger,* Biochem. J., v. 44, 126 (1949). [12] *Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, В. В. Нестеров,* ДАН, т. 172, 91 (1967). [13] *Е. П. Юликова, Л. К. Евсеенко и др.,* Хим. природн. соед., № 6, 817 (1975). [14] *T. Ando, S. Watanabe,* Intern. J. Protein Res., v. 1, 221 (1969). [15] *R. G. Fulcher, T. P. O'Brien, D. H. Simmonds,* Austral. J. Biol. Sci., v. 25, 487 (1972).