



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.964.4 : 577.156.2.08

ПРИМЕНЕНИЕ КАТЕПСИНА С ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ
ДЛИННЫХ ПЕПТИДОВ

Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Ранее рядом авторов [1—3] было показано, что катепсин С (дипептидиламинопептидаза I, КФ 3.4.4.9) может быть успешно использован в работе по определению аминокислотной последовательности пептидов. Однако при этом внимание обращалось главным образом на разработку методов разделения и определения структуры дипептидов, отщепленных с помощью катепсина С [1—4]. В случае длинных пептидов анализ дипептидных фрагментов позволяет определить строение лишь N-концевого участка той или иной длины, в зависимости от структуры. Однако определение N-концевой последовательности пептидов не является трудной задачей, в то время как изучение полной структуры длинных пептидов требует обычно значительных затрат труда и большого количества исследуемого материала.

В настоящем сообщении показано, что катепсин С может оказать существенную помощь и в определении полной структуры длинных пептидов. Предлагаемая схема анализа пептидов заключается в следующем.

1. Определение N-концевой аминокислотной последовательности исследуемого пептида одним из существующих методов.

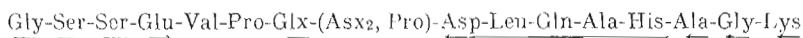
2. Отщепление дипептидных фрагментов от N-концевого участка пептида при исчерпывающем гидролизе катепсином С, причем число этих фрагментов зависит от положения «терминирующих» остатков (Pro, Lys или Arg) [1] в аминокислотной последовательности пептида.

3. Определение структуры нерасщепленного С-концевого фрагмента изучаемого пептида.

Характерной особенностью предлагаемой схемы анализа является использование С-концевого фрагмента, оставшегося после действия катепсина С, для структурного анализа классическими методами. Эта схема предполагает, что катепсин С способен отщеплять дипептидные фрагменты с выходом, близким к количественному; в противном случае наличие смеси гомологичных пептидов сделало бы невозможным структурный анализ С-концевого фрагмента.

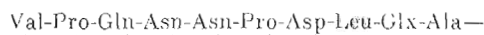
Поскольку отщепившиеся дипептиды могут затруднить определение последовательности С-концевого фрагмента, последний целесообразно отделить гель-хроматографией, хотя в принципе возможно изучение структуры С-концевого фрагмента и без отделения отщепившихся дипептидов путем непосредственного анализа смеси фрагментов без разделения [5].

Предложенная схема анализа была использована при установлении структуры пептида, выделенного из триптического гидролизата леггемоглобина из клубеньков люпина. Последовательной деградацией по методу Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоил- (→) и дансилпроизводных (←) аминокислот и действием карбоксипептидаз А, В и С (←) для этого пептида была найдена следующая частичная структура:

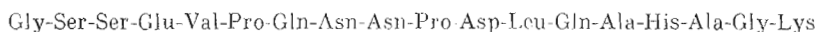


Опытами с различными препаратами катепсина С было установлено, что полного отщепления дипептидов с N-конца можно достичь лишь при использовании свежего препарата фермента. После ферментативного гидролиза пептида С-концевой фрагмент был выделен гель-хроматографией на колонке с биогелем Р-4. Поскольку пептид не содержал аминокислотных остатков, позволяющих применить спектрофотометрическое определение при 280 нм, отбор элюента по фракциям осуществлялся с использованием реперных веществ — голубого декстрана (M 2 000 000) и флуоресцеина (M 332). При этом применение капиллярной колонки позволило свести потери пептида вследствие адсорбции до минимума.

Для выделенного С-концевого фрагмента была определена следующая аминокислотная последовательность:



что позволило предложить для исследуемого пептида следующую полную структуру:



Таким образом, использование катепсина С с последующим анализом структуры нерасщепленного С-концевого фрагмента по методу Эдмана позволило легко и с затратой небольшого количества вещества определить полную структуру исследуемого пептида. Авторам представляется возможным также, после удаления по методу Эдмана «терминирующего» остатка от С-концевого фрагмента, проводить отщепление с помощью катепсина С следующего «блока» дипептидов и т. д. Такое последовательное применение энзиматической и химической деградации дало бы возможность определять строение любого участка длинного пептида. Анализ отделяемых смесей дипептидов при этом был бы полезен для подтверждения структуры отщепляемой части пептида.

Экспериментальная часть

Катепсин С выделяли из селезенки крупного рогатого скота по модифицированной методике Метрионе и соавт. [6], в которой стадия хроматографии на СМ-целлюлозе была заменена препаративным изоэлектрическим фокусированием в интервале рН 6—8. Полученный препарат не имел примесной протеолитической активности и хранился без потери активности в 0,9% NaCl при 4° в течение 2 месяцев.

Гидролиз пептида (0,2 мкмоль) катепсином С производили в активирующем пиридин-ацетатном буфере, рН 5,0 [1] при 37° в течение 3 ч. Гидролизат упаривали под вакуумом и, после добавления раствора голубого декстрана и флуоресцеина в воде, наносили в минимальном объеме на колонку (0,30 × 50 см) с биогелем Р-4 (100—200 меш), уравновешенную 0,1 н. NH_4HCO_3 . Элюцию производили тем же буфером с фракционированием области между голубой (декстран) и желтой (флуоресцеин) окраской элюента. После дансильного анализа были объединены фракции с N-концевой аминокислотой валином.

Аминокислотную последовательность исходного пептида и выделенного С-концевого фрагмента определяли последовательной деградацией по

методу Эдмана в ручном варианте с идентификацией фенилтиогидантоил- и дансилпроизводных аминокислот, а также действием карбоксипептидаз А, В и С.

Авторы выражают глубокую благодарность Н. А. Алдановой и В. М. Липкину за ценные советы при обсуждении результатов работы и оформлении статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Callahan P. X., McDonald J. K., Ellis S. (1972) *Fed. Proc.*, **31**, 1105—1113.
2. Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A. (1972) *FEBS Lett.*, **21**, 300—302.
3. Lindley H. (1972) *Biochem. J.*, **126**, 683—688.
4. Paukovits W. R. (1973) *J. Chromatogr.*, **85**, 154—158.
5. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жигулина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) *Биохимия*, **37**, 410—413.
6. Mettrione R. M., Neves A. G., Fruton J. S. (1966) *Biochemistry*, **5**, 1597—1604.

Поступила в редакцию
5.V.1975