



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.341*.3.02

РОЛЬ N-КОНЦЕВОЙ АМИНОГРУППЫ В АКТИВНОСТИ
ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Сижк П. Ф., Оза А. В., Лыокене А. Г., Аавиксаар А. А.

*Институт химической и биологической физики
Академии наук ЭССР, Таллин*

Гидролиз стабилизированных желчными кислотами эмульсий триглицеридов под действием панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) протекает эффективно только в присутствии белкового кофактора — колипазы [1, 2]. Показано [3, 4], что химическая модификация аминокрупп фермента цитраконовым ангидридом в низких концентрациях приводит к ингибированию этой «истинной» активности липазы, в то время как в отсутствие колипазы и желчной кислоты активность модифицированной липазы по отношению к нестабилизированной эмульсии субстрата (трибутирина) подавляется лишь частично.

В работе изучена стехиометрия реакции липазы с [2,3-³H]янтарным ангидридом, выявлена функциональная группа, модифицирование которой сопровождается ингибированием «истинной» активности фермента, и показано, что ингибирование связано с потерей способности сукцинированного фермента к сорбции на поверхности субстрата в присутствии колипазы и желчной кислоты.

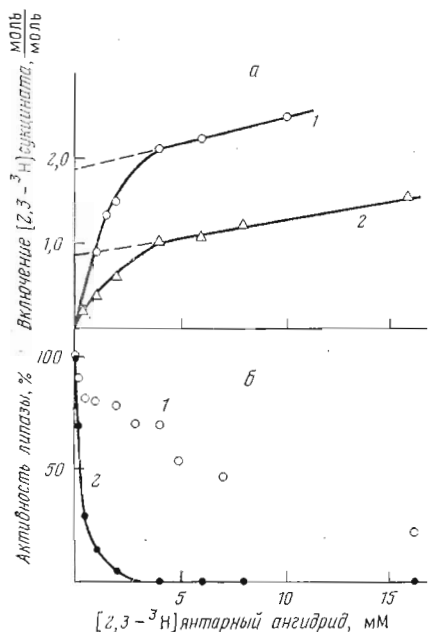
Количество [2,3-³H]сукцината, включаемого в молекулу фермента, быстро возрастает при низких концентрациях ангидрида, достигая молярного отношения 2:1 (рисунок, а, 1). Это количество не уменьшалось при обработке модифицированного фермента 0,3 М гидроксиламином при рН 7,5. Последующее увеличение концентрации добавляемого [2,3-³H]янтарного ангидрида (выше 4—5 мМ) приводит к медленному увеличению количества [2,3-³H]сукцината, включаемого в фермент. Из этих данных вытекает, что в панкреатической липазе имеются две аминокруппы с повышенной реакционной способностью. Поскольку «истинная» активность липазы практически полностью подавлялась при концентрациях ангидрида, достаточных для модифицирования этих аминокрупп (рисунок, б, 2), можно сделать вывод, что по крайней мере одна из них необходима для активности липазы в присутствии Na-TDC и колипазы.

При предварительной обработке липазы *n*-нитрофенилацетатом при рН 7,5 (с сохранением «истинной» активности фермента) [5] с помощью [2,3-³H]ядерного ангидрида достигается модификация лишь одной аминокруппы (рисунок, а, 2). Это сопровождается ингибированием «истинной» активности ацетилированного фермента, идентичным наблюдаемому при сукцинировании нативной липазы. Мы показали, что α -аминогруппа N-концевого остатка серина [6] блокирована как в моно-, так и в дисукцинированных производных фермента (в то время как в нативной липазе Ser определялся).

Сукцинированная липаза в отличие от нативной (см. также [4]) не сорбировалась на колонке с колипазой, иммобилизованной на агарозе, а также на поверхности эмульсии трибутирина в присутствии колипазы и 4 мМ Na-TDC.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что N-концевая α -аминогруппа фермента участвует в механизме, обеспечивающем

Сокращение: Na-TDC — тауродезоксихолат натрия.



Модифицирование липазы [2,3-³H]янтарным ангидридом (25° С, Na-веронал-НСl-буфер, I 40 мМ, рН 7,5). а — включение [2,3-³H]сукцината в фермент в зависимости от количества [2,3-³H]янтарного ангидрида, добавляемого к 20 мкМ раствору нативной (1) и модифицированной под действием *n*-нитрофенилацетата (2) липазы. б — зависимость активности липазы (0,33 нМ) по отношению к эмульсии трибутирина (25° С, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 1 мМ CaCl₂) (1) и по отношению к эмульсии трибутирина в присутствии 4 мМ Na-TDC и 3,3 нМ колипазы (25° С, рН 6,5, 0,15 М NaCl, 1 мМ CaCl₂) (2) от концентрации янтарного ангидрида, взятого для модификации

комплексообразование липазы с колипазой в истинном растворе и сорбцию липазы на поверхности субстратной эмульсии в мицеллярном растворе желчных кислот в присутствии колипазы.

Липазу и колипазу А1 из поджелудочной железы свиньи выделяли как описано ранее [7, 8]. Активность фермента определяли методом рН-статирования по максимальной скорости гидролиза эмульсии трибутирина в отсутствие и в присутствии 4 мМ Na-TDC и колипазы (10-кратный избыток).

Модификацию липазы [2,3-³H]янтарным ангидридом проводили при рН 7,5 (рН-стат). Избыток [2,3-³H]янтарной кислоты удаляли диализом.

Иммобилизацию колипазы на агарозе проводили так, как описано ранее [4].

Сорбцию модифицированной липазы (82 нМ) на поверхности эмульсии трибутирина, стабилизированной 4 мМ Na-TDC, в присутствии и в отсутствие 410 нМ колипазы (25° С, рН 7,5, Na-веронал-НСl, I 40 мМ) оценивали по остаточной активности раствора после осаждения диспергированной липидной фазы центрифугированием [9].

N-Концевую кислоту в молекуле липазы (Ser [6]) определяли дансильным методом [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Séméria M., Desnuelle P. Adv. Enzymol., 1979, v. 48, p. 319—370.
2. Borgström B., Erlanson-Albertsson C., Wieloch T. J. Lipid Res., 1979, v. 20, № 3, p. 805—816.
3. Erlanson C. FEBS Lett., 1977, v. 84, № 1, p. 79—82.
4. Patton J. S., Albertsson P.-Å., Erlanson C., Borgström B. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 12, p. 4195—4202.
5. Chapus C., Séméria M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. Biochemistry, 1976, v. 15, № 23, p. 4980—4987.
6. Ravery M., Boudouard M., Bianchetta J. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 525, № 2, p. 373—379.
7. Sikk P., Osa A., Aaviksaar A. FEBS Lett., 1985, v. 184, № 2, p. 193—196.
8. Chapus C., Desnuelle P., Foglizzo E. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 1, p. 99—105.
9. Borgström B. J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 2, p. 411—417.
10. Gray W. R. Meth. Enzymol., 1972, v. 25B, p. 121—138.

Поступило в редакцию
27.XII.1985

THE ROLE OF N-TERMINAL AMINO GROUP IN THE ACTIVITY
OF PANCREATIC LIPASE

SIKK P. F., OSA A. V., LÓOKENE A. G., AAVIKSAAR A. A.

*Institute of Chemical Physics and Biophysics, Academy
of Science of the Estonian SSR, Tallinn*

Chemical modification of porcine pancreatic lipase by increasing amounts of [2, 3-³H] succinic anhydride revealed the presence of two highly reactive amino groups in the enzyme. The initial modification of lipase with *p*-nitrophenyl acetate enabled practically selective modification of a single amino group in the enzyme molecule. The lipolytic activity of succinylated enzymes in micellar solution of sodium taurodeoxycholate in the presence of 10-fold excess of colipase was completely suppressed, and the mono-succinylated lipase did not bind to colipase-agarose column or to the surface of tributyrin emulsion in micellar solution of taurodeoxycholate in the presence of colipase. It was concluded that the N-terminal α -amino group of the enzyme is essential for lipase-colipase complex formation in true solution and for enzyme binding to the bile salt covered substrate surface in the presence of colipase.