



УДК 577.152.341*61'134

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Y МЕТОДОМ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО
ОБРАТИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ

Попов А. А., Ротанова Т. В., Руми Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Изучено ингибирующее действие борорганических кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=2-7$) и $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=0, 2-4$) на ферментативную активность нативной и ртутьмодифицированной карбоксипептидазы Y из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в реакции гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина.

Из анализа зависимости констант ингибирования от размера и структуры углеводородной цепи ингибитора сделано заключение о строении активного центра фермента. Показано, что по топографии активного центра карбоксипептидаза Y сходна с химохитринсом и отличается от субтилизина BPN'.

Карбоксипептидаза Y (КФ 3.4.16.1) относится к интересной группе тиолзависимых сериновых протеиназ. Особенностью этих ферментов является то, что наряду с обычными компонентами активного центра сериновых протеиназ, а именно с остатками серина, гистидина и аспарагиновой кислоты, они содержат существенную для активности сульфгидрильную группу. Известные к настоящему времени представители тиолзависимых сериновых протеиназ относятся к одному из двух типов ферментов — к эндопептидазам типа субтилизина [1] или к карбоксипептидазам [2, 3]. Тиолзависимые сериновые эндопептидазы изучены достаточно подробно: показано, что все ферменты этого типа имеют молекулярную массу около 30 000, рН-оптимум их действия находится в слабощелочной области (рН 8,5), они обладают сходными аминокислотными последовательностями N- и C-концевых участков, определена полная первичная структура ряда представителей этой подгруппы ферментов [4].

В отношении тиолзависимых сериновых карбоксипептидаз имеющиеся сведения весьма ограничены: молекулярные массы этих ферментов различны и варьируют от 50 000 до 160 000, рН-оптимум действия обычно лежит в кислой области (рН 3–6) [2, 3], в отличие от классических карбоксипептидаз (например, карбоксипептидазы А) рассматриваемые ферменты не являются металлозависимыми [2, 3]. Что касается карбоксипептидазы Y, то она является гликопротеином с молекулярной массой 60 000, обладает пептидазной, амидазной и эстеразной активностями, при этом оптимум пептидазной активности обнаруживается при рН 6,5, эстеразной — при рН 8,0, а амидазной — при рН 7,5 [5].

Известно, что последовательность аминокислот в окружении реакционноспособных остатков активного центра фермента является наиболее консервативной частью молекулы и служит одним из отличительных признаков принадлежности фермента к той или иной подгруппе. Установлено, что аминокислотная последовательность в области серина активного центра (Ser^{146}) карбоксипептидазы Y (-Gly-Glu-Ser-Tyr-Ala-) [6] отличается от последовательности (-Asp-Ser-Gly-Glu-Pro-), обнаруженной в панкреатических сериновых протеиназах, в протеиназах крови и в некоторых протеиназах микробов [6], но более или менее сходна с последовательностью (-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-) в молекулах бактериальных ферментов типа субтилизина [6]. Отмечена также гомология на участках -Val⁹¹ — Ser¹⁰⁷- и -Trp³⁴⁹ — Val³⁶⁶- молекулы карбоксипептидазы Y и -Val⁹² — Ser¹⁰⁷- и -Asp¹⁶³ — Val¹⁸⁰- субтилизина Карлсберг соответственно [7]. В связи с этим представляется интересным сопоставить топографию активных цент-

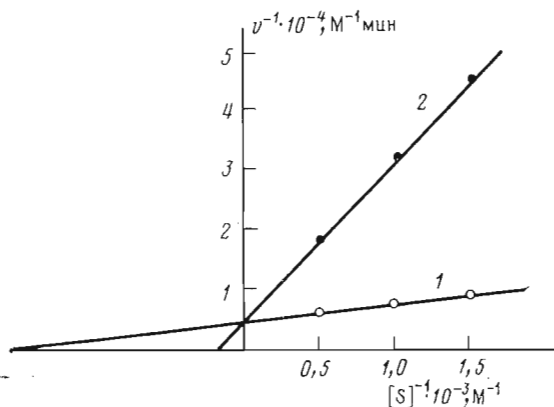


Рис. 1. Ингибирование амилборной кислотой гидролиза АТЭЕ, катализируемого карбоксипептидазой У. Условия определения: рН 7,5; 25° С, $[E]_0 = 1,8 \cdot 10^{-8}$ М, $[I] = 0$ (1), $1,2 \cdot 10^{-3}$ М (2)

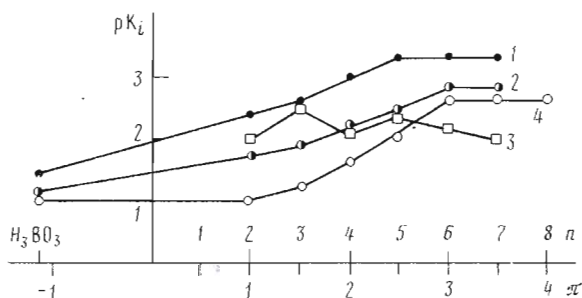


Рис. 2. Зависимость эффективности ингибирования протеиназ от размера углеводородного радикала (n) в молекуле алкилборной кислоты и константы его гидрофобности (π): 1 – нативная карбоксипептидаза У, 2 – ртутьмодифицированная карбоксипептидаза У, 3 – субтилизин ВРН' [10], 4 – хлмотрипсин [8]. Для ОН-группы (молекула H_3BO_3) $\pi = -1,16$ [14]

ров карбоксипептидазы У и других сериновых протеиназ, в особенности субтилизинов.

Для проведения такого сопоставления был выбран разработанный в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ им. М. М. Шемягина метод бифункционального обратимого ингибирования протеиназ борорганическими кислотами, с помощью которого ранее были исследованы активные центры химотрипсина [8], мезентериконептидазы [9], субтилизина ВРН' [10], урокиназы, трипсина [11]. Для этих протеиназ, а также для целого ряда сериновых гидролаз была установлена протяженность связывающих участков и определено их расположение относительно каталитических центров.

В данной работе мы изучали взаимодействие ряда алкил- и аралкилборных кислот общей формулы $R(CH_2)_nB(OH)_2$, где при $R=H$ $n=2-7$, а при $R=C_6H_5$ $n=0,2-4$ соответственно, с нативной и ртутьмодифицированной [5, 12] карбоксипептидазой У.

Известно, что модификация фермента ионами Hg^{2+} с последующим добавлением галогенов приводит к изменению каталитических свойств карбоксипептидазы У, причем предполагается, что это изменение сопровождается перестройкой в связывающем участке активного центра фермента [13]. Мы полагали, что такую перестройку можно будет «зафиксировать» при исследовании активного центра фермента выбранным нами методом.

В качестве субстрата использовали этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина (АТЭЕ).

Эффективность ингибирования нативной (А)
и ртутьмодифицированной карбоксипептидазы Y (Б)
борной, алкил- и аралкилборными кислотами

R(CH ₂) _n B(OH) ₂		K _i , мМ	
R	n	А	Б
H ₃ BO ₃		35	80
H	2	4,0	19
H	3	2,5	12
H	4	1,0	6,3
H	5	0,5	3,75
H	6	0,5	1,65
H	7	0,5	1,65
C ₆ H ₅	0	1,84	0,62
C ₆ H ₅	2	0,06	0,044
C ₆ H ₅	3	0,21	0,22
C ₆ H ₅	4	0,21	0,22

На примере амилборной кислоты было показано, что ингибирование гидролиза АТФЕ борорганическими кислотами носит конкурентный характер (рис. 1). Вследствие этого константы ассоциации ингибитора со свободной формой фермента (K_i) при условии $[I] \gg [E]$ определяли по уравнению

$$K_i = \frac{K_m}{K_m + [S]} \cdot \frac{[I]}{v/v_i - 1},$$

где K_m — константа Михаэлиса, v и v_i — начальные скорости гидролиза субстрата в отсутствие и соответственно при наличии ингибитора в реакционной среде. Полученные результаты приведены в таблице.

Из данных, представленных на рис. 2 (кривая 1), видно, что при увеличении длины алкильного радикала в молекуле ингибитора вплоть до $n=5$ эффективность ингибирования нативной карбоксипептидазы Y монотонно возрастает. Дальнейшее наращивание углеводородного радикала ($n > 5$) не приводит к изменению степени ингибирования.

Аналогичный характер зависимости наблюдается и при ингибировании модифицированного фермента (рис. 2, кривая 2). Однако в этом случае константа ингибирования достигает максимального значения при $n=6$ (гексилборная кислота). Следует отметить, что борная кислота несколько более эффективно связывается с нативным ферментом, чем с модифицированным, в то же время максимальный вклад углеводородного радикала ингибитора в связывание с обеими формами фермента практически одинаков: ΔpK_i ($n=0-5$) = 1,84, (для нативного фермента) и ΔpK_i ($n=0-6$) = 1,68 (для модифицированного фермента).

Для сравнения на рис. 2 приведены данные по ингибированию алкилборными кислотами субтилизина ВРН' и химотрипсина (кривые 3 и 4 соответственно). Видно, что зависимости степени ингибирования от размера углеводородного радикала в молекуле алкилборной кислоты для карбоксипептидазы Y и субтилизина (фермента, наиболее близкого к карбоксипептидазе Y по первичной структуре) полностью различаются (рис. 2, кривые 1-3). Из этого следует, что и топография активных центров этих ферментов вряд ли имеет черты сходства.

Вместе с тем интересно, что профиль кривых 1 и 2 в целом сходен с профилем кривой 4 (для химотрипсина) — наблюдается возрастание на начальной ветви кривой и достижение «насыщения» при определенном значении n . Однако имеется и существенное различие: в случае химотрипсина практически не обнаруживается разницы в степени ингибирования между борной, этилборной и пропилборной кислотами, в случае же карбоксипептидазы Y эффективность ингибирования возрастает при переходе от борной к пропилборной кислоте.

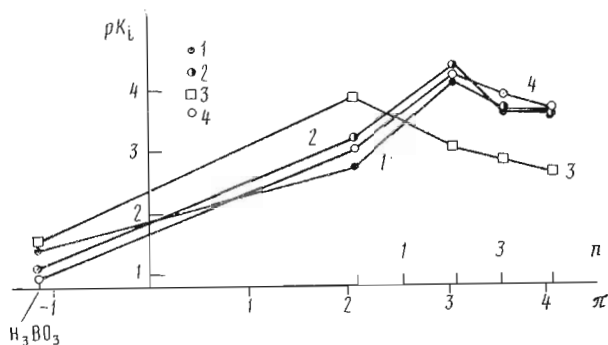


Рис. 3. Зависимость эффективности ингибирования протеиназ от структуры углеводородного радикала (n) в молекуле аракилборной кислоты и константы его гидрофобности (π): 1 – нативная карбоксипептидаза Y, 2 – ртутьмодифицированная карбоксипептидаза Y, 3 – субтилизин BPN' [10], 4 – химотрипсин [8]

Полученные результаты свидетельствуют о том, что связывающий участок активного центра нативной карбоксипептидазы Y примыкает к ее каталитическому центру и имеет протяженность, соответствующую длине углеводородного радикала из 5 метиленовых звеньев. При модификации фермента топография его активного центра несколько меняется и связывающий участок становится более протяженным (способным связать до 6 метиленовых звеньев). Таким образом, активный центр карбоксипептидазы Y по топографии сходен с активным центром химотрипсина с тем отличием, что в изучаемом ферменте не разобщены каталитический и сорбционный участки.

Известно, что связывание лигандов в активном центре химотрипсина осуществляется за счет гидрофобного взаимодействия [8]. Инкремент свободной энергии связывания алифатических соединений при реализации такого типа взаимодействий составляет -700 кал/моль в расчете на одно метиленовое звено [14]. В случае связывания алкилборных кислот с карбоксипептидазой Y расчет приводит к более низким значениям для инкремента: -500 кал/моль для нативного фермента и -400 кал/моль для модифицированного. Таким образом, при связывании алкилборных кислот в активном центре карбоксипептидазы Y гидрофобное взаимодействие реализуется не полностью. Вместе с тем надо отметить, что по общей степени гидрофобности активные центры карбоксипептидазы Y и химотрипсина мало различаются: максимальная энергия связывания углеводородной цепи алкилборной кислоты в связывающем центре фермента равна 2,4; 2,2; 2,1 ккал/моль для нативной, модифицированной карбоксипептидазы Y и химотрипсина соответственно.

Дополнительную информацию о структуре связывающего участка фермента можно получить, изучая взаимодействие фермента с ингибитором, имеющим объемистый ароматический остаток. Из рис. 3 видно, что зависимости эффективности ингибирования нативной и модифицированной карбоксипептидазы Y аракилборными кислотами от структуры гидрофобного радикала в молекуле ингибитора в данном случае практически идентичны (кривые 1 и 2). Они резко отличаются от зависимости для субтилизина (кривая 3) и очень близки соответствующей зависимости для химотрипсина [8] (кривая 4). Максимум эффективности ингибирования наблюдается в случае фенилэтилборной кислоты. Принимая во внимание, что размер фенильного радикала приблизительно соответствует длине алифатической цепи из 3,5 звеньев $-CH_2-$, можно сделать заключение, что результаты ингибирования карбоксипептидазы Y аракилборными кислотами хорошо согласуются с приведенными выше данными для ингибирования фермента алкилборными кислотами.

Таким образом, активный центр карбоксипептидазы У можно представить в виде непосредственно примыкающих друг к другу каталитического участка и области гидрофобного связывания, способной вмещать до 5 (для нативного фермента) или 6 метиленовых звеньев (для модифицированного фермента).

Авторы выражают признательность проф. В. К. Антонову за интерес к работе и полезное обсуждение результатов.

Экспериментальная часть

Карбоксипептидаза У из пекарских дрожжей — препарат НПО «Биолар» (г. Олайне), активность 40 мкмоль/мин·мг при гидролизе АТФЕ. Используются НЕРЕС (N-2-(гидроксипропил)пиперазин-N-3-пропансульфоновая кислота; Serva, ФРГ), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), АТФЕ (Reanal, Венгрия). Все остальные реактивы — препараты объединения «Союзреактив» марки х. ч.

Алкилборные кислоты $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=2-7$) и аракилборные кислоты $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=2-4$) синтезированы по методике работы [15].

Эстеразную активность карбоксипептидазы У определяли по скорости гидролиза 1 мМ раствора АТФЕ в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5 [15].

Модификация карбоксипептидазы У действием HgCl_2 . К 1 мл раствора фермента в воде ($1,4 \cdot 10^{-4}$ М) добавляли 0,1 мл 0,5 М НЕРЕС-буфера, рН 5,5, и 40 мкл водного раствора HgCl_2 (10^{-2} М). Смесь выдерживали 15 мин при 20° С и затем 8 ч при 0° С. Обессоливание белка проводили на колонке с сефадексом G-25 (1,5×7 см), уравновешенным 5 мМ К, Na-фосфатным буфером, рН 7,5.

Ингибирование карбоксипептидазы У алкил- и аракилборными кислотами.

а) Нативный фермент. К 1,91 мл 1 мМ раствора АТФЕ в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1% метанола, добавляли аликвоты (от 20 до 80 мкл) запасного раствора ингибитора в метаноле (диапазон конечных концентраций ингибитора 10^{-4} — $8,0 \cdot 10^{-2}$ М, метанола — 5%) и 10 мкл раствора карбоксипептидазы У (конечная концентрация $7 \cdot 10^{-7}$ М). За гидролизом субстрата следили с помощью спектрофотометра «Gilford» (США) ($\lambda=237$ нм, 25° С, $\epsilon_{237}=200$ см $^{-1}$ ·М $^{-1}$).

б) Модифицированный фермент. К 1,9 мл 1 мМ раствора АТФЕ в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1% метанола, добавляли аликвоты (от 20 до 80 мкл) запасного раствора ингибитора в метаноле (диапазон конечных концентраций ингибитора 10^{-4} — $8,0 \cdot 10^{-2}$ М, метанола — 5%), 10 мкл ртутьмодифицированной карбоксипептидазы У (конечная концентрация $6 \cdot 10^{-8}$ М) и 10 мкл раствора KI (10^{-3} М) в воде для активации модифицированного фермента. Гидролиз регистрировали как описано для нативного фермента.

Константы ингибирования определяли из графиков зависимости v/v_0 от [I]. Ошибка не превышала 15%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 100. № 4. P. 1680—1687.
2. Yokoyama S., Ichishima E. // Agr. Biol. Chem. 1972. V. 36. P. 1259—1261.
3. Yokoyama S., Oobayashi A., Tanabe O. // Appl. Microbiol. 1974. V. 27. P. 953—960.
4. Заглицько О. Н., Честухина Г. Г., Ревина Л. П., Степанов В. М. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 383—389.
5. Hayashi R. // Meth. Enzymol. 1976. V. 45A. P. 568—587.
6. Funakoshi T., Shoji S., Yokoyama R., Ueki H., Kubota Y. // Chem. Pharm. Bull. 1983. V. 31. P. 198—203.
7. Svendsen J., Martin B. M., Vismanatha T., Johansen J. T. // Carlsberg. Res. Commun. 1982. V. 47. P. 15—27.
8. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. // FEBS Lett. 1970. V. 7. № 1. P. 23—25.
9. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjiva A., Blagoev B. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1976. V. 8. № 3. P. 225—231.
10. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гиподман Л. М., Антонов В. К. // Биоорганическая химия. 1978. Т. 4. № 5. С. 694—698.
11. Ротанова Т. В., Иомгова В. М., Благоев Б., Антонов В. К. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1659—1665.
12. Bai Y., Hayashi R. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 17. P. 8473—8479.
13. Breddam K. // Carlsberg Res. Commun. 1983. V. 48. P. 9—19.
14. Leo A., Hansch C., Elkins D. // Chem. Rev. 1971. V. 71. № 6. P. 525—616.
15. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. // Молекулярная биология. 1970. Т. 4. № 4. С. 558—570.

Поступила в редакцию
8.VI.1988

STUDIES OF THE TOPOGRAPHY OF THE CARBOXYPEPTIDASE Y
ACTIVE SITE BY THE BIFUNCTIONAL REVERSIBLE
INHIBITORS METHOD

POPOV A. A., ROTANOVA T. V., RUMSH L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Inhibitory effect of organo-boronic acids, $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=2-7$) and $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n=0, 2-4$), on the enzymatic activity of native and Hg-modified forms of carboxypeptidase Y from *Saccharomyces cerevisiae* in the hydrolysis of ethyl N-acetyl-L-tyrosinate has been studied. Structure of the active site is proposed from analysis of inhibition constants as functions of length and structure of the inhibitor's hydrocarbon chain. In topography of the active site, carboxypeptidase Y is shown to resemble chymotrypsin but to differ from subtilisin BPN'.