



УДК 577.15.04

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ОКРАШЕННЫЙ КАРБОДИМИД — СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР АСПЕРГИЛЛОПЕПСИНА А

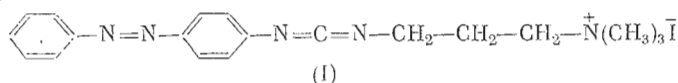
Лысогорская Е. Н., Баландина Г. И., Степанов В. М.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Исследовалась реакция водорастворимого окрашенного *N*-*n*-фенилазофенил-*N'*-(γ -диметиламинопропил)карбодимида (ФАДК) с аспергиллопепсином А — карбоксильной протеиназой гриба *Asp. awamori* при pH 5,6 в водном растворе. Установлено, что включение одного остатка ФАДК происходит уже при двукратном избытке реагента и сопровождается полной инактивацией фермента. Изучение пепсинового гидролизата модифицированного белка показало, что ФАДК реагирует с аспарагиновой кислотой в последовательности *Pe-Ala-Asp-Thr-Gly* (последовательность А) и ω -карбоксильной группой остатка аминокислотной кислоты в последовательности *Asx-Asx-Glx* (последовательность В). Последовательность А гомологична последовательностям аминокислот из активных центров ряда карбоксильных протеиназ. Предполагается, что последовательность В находится в *N*-концевой части молекулы аспергиллопепсина А (остатки 13—15) и, возможно, также функционально важна. Реакция с ФАДК высокоспецифична для аспергиллопепсина А, но малоспецифична для пепсина свиньи, что свидетельствует о некотором различии в строении активных центров этих ферментов.

Карбодимиды нашли широкое применение в качестве реагентов для химической модификации карбоксильных групп белков [1]. При взаимодействии карбодимидов с карбоксильными группами могут протекать реакции, приведенные на схеме. Для химической модификации белков обычно используется реакция А, основанная на присоединении подходящего нуклеофила к карбоксильной группе, активированной карбодимидом. Реакция Б применяется реже, по-видимому, из-за малой доступности карбодимидов, несущих радиоактивную или хромофорную метку.

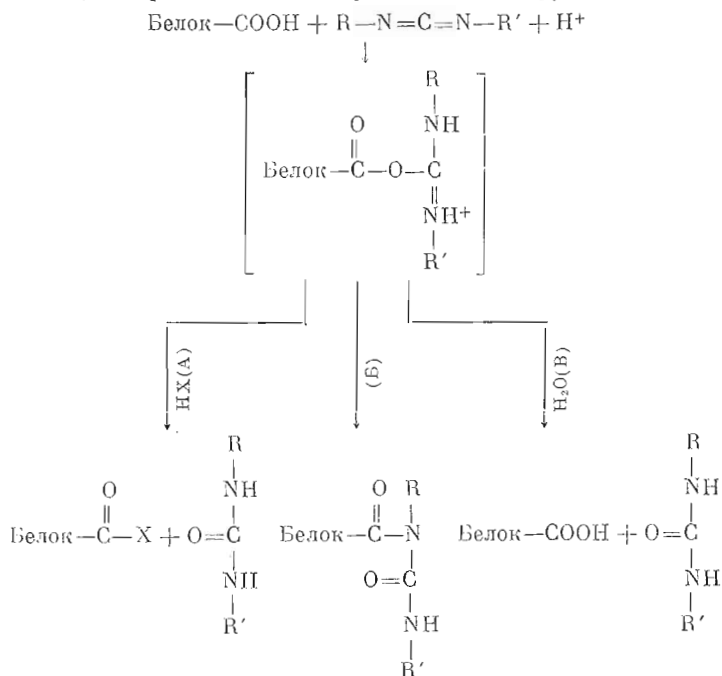
Ранее мы сообщали о синтезе водорастворимого окрашенного карбодимида, который может быть использован в качестве реагента для модификации белков [2]. Иодметилат *N*-*n*-фенилазофенил-*N'*-(γ -диметиламинопропил)карбодимида (ФАДК) (I) содержит хромофорную группу, позволяющую контролировать ход реакции с белком и идентифицировать продукты реакции:



Данная работа посвящена исследованию взаимодействия ФАДК с аспергиллопепсином А — внеклеточной карбоксильной протеиназой из гриба *Aspergillus awamori*.

Аспергиллопепсин А является функциональным и структурным аналогом пепсина [3]. Специфические для карбоксильных протеиназ ингиби-

Реакции карбодимидов с карбоксильными группами белков



торы, содержащие диазоацетильную или эпоксидную группировки, полностью инактивируют фермент. Показано, что N-диазоацетилдинитрофенилэтилендиамина избирательно модифицирует β-карбоксильную группу остатка аспарагиновой кислоты в последовательности Pe-Ala-Asp аспергиллопепсина, гомологичной окружению активного остатка аспарагиновой кислоты в других карбоксильных протеиназах [4]. Все это позволило предположить общность механизма каталитического действия аспергиллопепсина А с другими карбоксильными протеиназами и участие в этом механизме нескольких карбоксильных групп.

Реакцию аспергиллопепсина А в водном растворе проводили с различными концентрациями ФАДК (соотношение реагентов от 1 : 2 до 1 : 30) при рН 5,6 в течение 1 ч при 20°, выделяя модифицированный белок гель-фильтрацией на сефадексе G-25. В УФ-спектре модифицированного белка

появлялся характерный дополнительный максимум при 325 нм (рис. 1), что свидетельствовало о присоединении карбодимида.

Как известно, карбодимиды реагируют в белках преимущественно с карбоксильными группами, однако отмечались их реакции также с оксигруппами серина, треонина и тирозина, с аминокетонами лизина и имидазолом гистидина. Модификация лизина и гистидина в условиях реакции с аспергиллопепсином А при рН 5,6 маловероятна, так как боковые группы этих аминокислот реагируют с карбодимидами в непротонированной форме [5]. Обработка модифицированного белка

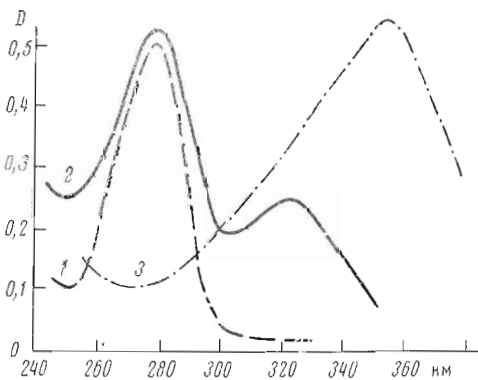
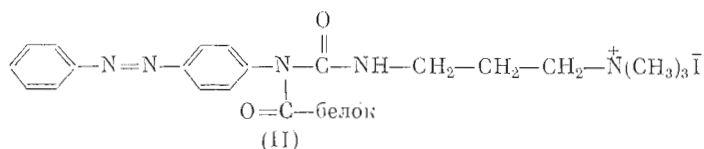
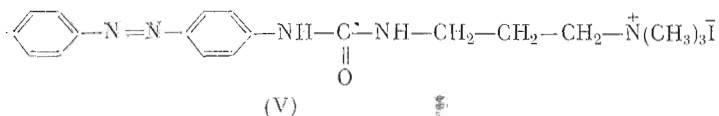
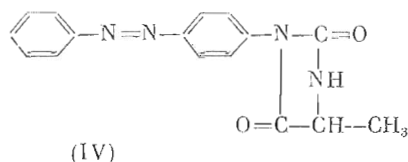
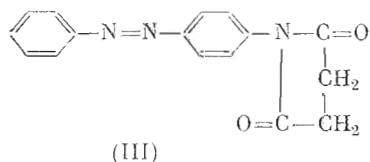


Рис. 1. УФ-спектры аспергиллопепсина А (1), аспергиллопепсина А, модифицированного одним остатком ФАДК (2), ФАДК (3)

гидроксиламиноом не приводит к отщеплению хромофорной метки, что исключает взаимодействие с оксигруппами [6]. Таким образом, наиболее вероятно, что в реакцию вовлекаются карбоксильные группы фермента с образованием N-ацилмочевины. Известно, что карбодимиды, имеющие разные заместители, образуют N-ацилмочевины по наименее основному атому азота. Следовательно, можно предположить образование структуры типа (II):



Такая структура подтверждается и УФ-спектром продукта присоединения (в дальнейшем мы будем называть соединение типа (II) аспергиллопепсином А, модифицированным ФАДК). Соединения, моделирующие структуру (II), — N-фенилазофенилсукцинимид (III) [7] и 5-метил-3-фенилазофенилгидантоин (IV) [2] — также имеют в УФ-спектре характерный максимум при 325 нм.



Для сравнения укажем, что ФАДК, соответствующее ему производное мочевины (V) и тиомочевины имеют максимум поглощения при 355 нм. Коэффициент молярной экстинкции соединений (III) и (IV) ϵ 22 000 мы использовали для подсчета числа остатков карбодимида, присоединившихся к молекуле аспергиллопепсина А.

Окрашенный карбодимид реагирует с аспергиллопепсином А даже при эквимолярном соотношении реагентов, при этом включение ФАДК составляет 0,64 моль/моль белка. Дальнейшее увеличение концентрации карбодимида в реакционной смеси ведет к возрастанию включения реагента в белок (табл. 1). При 2-кратном избытке ФАДК включение составляет ~ 1 остаток, при 10-кратном избытке — 2,6—3,0 остатка. Обработка 30-кратным избытком реагента не приводит к значительному изменению содержания ФАДК, оно остается равным 3—3,5 остатка на молекулу белка. При более высоких концентрациях карбодимида модифицированный белок выпадает в осадок, что затрудняет его исследование.

В избранных нами условиях реакция заканчивается за 1 ч. Так, например, при 5-кратном избытке ФАДК через 15 мин после начала реакции включение составило 1,4 остатка, через 60 мин — 2. Увеличение времени реакции до 4 ч не приводит к возрастанию включения ФАДК.

Модификация аспергиллопепсина А ФАДК вызывает инактивацию фермента. Так, при включении 0,64 остатка карбодимида белок сохраняет только 30% первоначальной активности, при включении 0,9 остатка — 10%. Полная инактивация фермента происходит при включении 1 остатка окрашенного реагента. Включение ФАДК в молекулу белка хорошо коррелирует с инактивацией фермента. Включение 1 остатка ФАДК уже при небольшом избытке реагента, сопровождающееся полной инактивацией, свидетельствует о высокой избирательности ФАДК, который, по видимому, блокирует функционально важные группы фермента. Так как

Модификация аспергиллопепсина А и пепсина свиньи ФАДК
(60 мин, рН 5,6)

[ФАДК]:[белок], моль/моль	Аспергиллопепсин А		Пепсин свиньи	
	число остатков ФАДК на молеку- лу белка	активность фермента, %	число остатков ФАДК на молеку- лу белка	активность фермента, %
—	—	100	—	100
1	0,64	30	0,76	80
2	1,1	0	1,5	68
4			2,2–2,4	50
5	2	0	2,4	40
10	2,4	0	4,0	30
30	3,5	0	6,5	11–17

полная инактивация аспергиллопепсина А достигается при 2-кратном избытке ФАДК при рН 5,6, мы подробнее изучили влияние некоторых факторов на протекание реакции при данном соотношении фермента и модифицирующего агента. Снижение рН реакционной среды до 4,75 практически не влияет на включение ФАДК, которое составляет при этом 0,92 остатка на молекулу белка. Дальнейшее снижение рН сопровождается быстрой гидратацией карбодиимида. При рН 6,0 включение составляет также 1 остаток на молекулу белка. В нейтральных и щелочных средах аспергиллопепсин А инактивируется.

Высокая концентрация нуклеофила — хлоргидрата метилового эфира глицина (1 М) — снижает включение ФАДК до 0,45 остатка, при этом активность белка сохраняется равной 55% от исходной. Модификация активированной карбоксильной группы нуклеофилом (путь А в схеме) практически не происходит, так как образование амидной связи, приводящее к блокированию карбоксильной группы, должно было бы сопровождаться полной инактивацией фермента. Вероятно, снижение включения ФАДК связано не с нуклеофильностью хлоргидрата метилового эфира глицина, а с тем, что высокая концентрация последнего затрудняет образование комплекса между положительно заряженным ФАДК и карбоксильными группами белка. В пользу этого предположения свидетельствует и то, что проведение реакции модификации в 0,5 М КСl также сопровождается снижением включения ФАДК до 0,45 остатка с сохранением 50% активности.

Далее изучали модифицированный аспергиллопепсин А, содержащий 1 остаток ФАДК на молекулу. Его хроматография на DEAE-целлюлозе показала, что белок гомогенен и связывается с DEAE-целлюлозой несколько слабее, чем нативный фермент (рис. 2). Чтобы проверить возможное влияние модификации на субстратсвязывающий участок фермента, была проведена хроматография модифицированного фермента на аффинном сорбенте — сефарозе 4 В, содержащей в качестве лиганда метиловый эфир ϵ -аминокапронил-*L*-фенилаланил-*D*-фенилаланина [8]. Установлено, что модифицированный фермент ведет себя точно так же, как и исходный. Это может служить указанием на то, что зона связывания с субстратом не подверглась при модификации существенным изменениям.

С целью идентификации функциональной группы аспергиллопепсина А, реагирующей с ФАДК, модифицированный белок гидролизовали пепсином. Хроматография гидролизата на сефадексе G-25 дает три окрашенные фракции (рис. 3). Фракция I соответствовала негидролизованному белку. Фракции II и III содержали окрашенные пептиды, их подвергали дальнейшей очистке электрофорезом на бумаге при рН 2,2; 4,3; 5,6 и хроматографией в системе метилэтилкетон — *трет*-бутанол — вода (2 : 1 : 1).

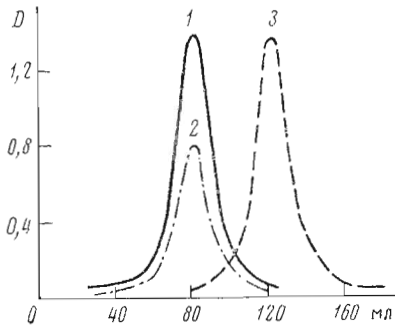


Рис. 2. Хроматография модифицированного (1, 2) и нативного (3) аспергиллопепсина А на ДЕАЕ-целлюлозе: 1, 3 — контроль D_{280} , 2 — D_{235}

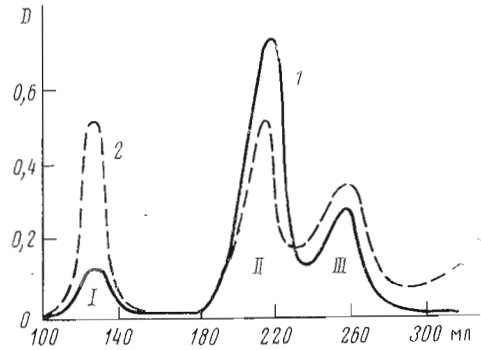


Рис. 3. Хроматография пепсинового гидролизата модифицированного аспергиллопепсина А на сефадексе G-25: пик I — негидролизованный белок, пики II, III — окрашенные пептиды. I — D_{280} , 2 — D_{235}

Из фракции II был выделен окрашенный пептид А, положительно заряженный при рН 2,2—5,6. Заряд обусловлен присутствием в пептиде остатка карбодиимида, несущего катионную группировку. Окрашенный пептид В, выделенный из фракции III, нейтрален при рН 5,6 и положительно заряжен при рН 2,2 и 4,3 (табл. 2). Необходимо отметить, что пептид А менее устойчив, чем пептид В. При его очистке мы наблюдали частичное отщепление соединения (V), которое хорошо отделялось при электрофорезе при рН 4,3 и 5,6 и имело характерный максимум в УФ-спектре при 355 нм. Аминокислотный состав пептидов хорошо соответствовал количеству ковалентно связанного ФАДК (табл. 3). Последовательность аминокислот в пептидах определялась методом Эдмана в сочетании с дансильрованием

пептид А Ile-Ala-Asp-Thr-Gly

пептид В Asx-Asx-Glx

В пептиде А ФАДК присоединялся к β -карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты. Локализовать место связывания ФАДК в пептиде В не удалось, так как ни карбоксипептидаза А, ни карбоксипептидаза из *Asp. oryzae*, обладающая широкой специфичностью [9], ни аминопептидаза из *Asp. oryzae* не гидролизовали этот пептид.

При сравнении пептида А с известными аминокислотными последовательностями ряда карбоксильных протеиназ обнаружено соответствие его структуры пептидам, выделенным из активных центров пепсинов свиньи и быка, и полная гомология пептидам активных центров пенициллопепсина и аспергиллопепсина А. Остаток аспарагиновой кислоты в этих последовательностях реагирует с диазкарбонильными соединениями — специфич-

Таблица 2

Электрофоретические подвижности окрашенных пептидов

рН	Напряжение, В	Время, ч	Смещение к катоду, см		
			пептид А	пептид В	соединение (V)
2,2	1000	5	11	14	14
4,0	1000	4	5	3	8
4,3	1200	4	6	3	9
5,6	1000	4	5	0	9

Аминокислотный анализ окрашенных пептидов

Аминокислота	Количество аминокислоты, нмоль	нмоль аминокислоты	
		нмоль ФАДК	
Пептид А			
ФАДК	40	—	
Asp	49	1,2	
Thr	49	1,2	
Gly	45	1,12	
Ala	40	1,0	
Ile	40	1,0	
Пептид В			
ФАДК	45	—	
Asp	96	2,13	
Glu	53	1,17	

ческими ингибиторами группы карбоксильных протеиназ.

Пепсин свиньи [10]	Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu
Пепсин быка [11]	Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser
Пенициллопепсин [12]	Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Thr-Leu
Аспергиллопепсин А [4]	Ile-Ala-Asp
Аспергиллопепсин А (наши данные)	Ile-Ala-Asp-Thr-Gly

Таким образом, одна из карбоксильных групп, реагирующих с ФАДК в аспергиллопепсине А, принадлежит аспарагиновой кислоте, входящей в состав активного центра фермента.

Последовательность аминокислот, соответствующая пептиду В, не найдена в пепсине свиньи. В N-концевой части молекулы пенициллопепсина имеется последовательность Asp-Asp-Glu, соответствующая пептиду В; подобная последовательность обнаружена также в N-концевой части молекулы аспергиллопепсина А. Мы предполагаем, что именно в этом участке находится вторая карбоксильная группа, реагирующая с ФАДК. Сравнение N-концевых областей различных карбоксильных протеиназ показывает, что гомология структур здесь значительно ниже, чем в районах активных центров:

1. Пепсин свиньи [13]	H-Ile-Gly-Asp-Glu-...
2. Пенициллопепсин [14]	H-Ala-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Thr-Asn-Thr-
3. <i>Rhizopus</i> -пепсин [15]	H-Ala-Gly-Val-Gly-Thr-Val-...
4. Аспергиллопепсин А [16]	H-Ser-Lys-Gly-Ser-Ala-Val-Thr-Thr-

1. -Pro-Leu-Glu-Asn-Tyr-...-Leu-Asp-Thr-Glu-Tyr-Phe
2. -Pro-Thr-Ala-...-...-Asn-Asp-Glu-Glu-Tyr-Ile
3. -Pro-Met-Thr-Asn-Tyr-Gly-Asn-Asp-Val-Glu-Tyr-Glu
4. -Pro-...-Glu-Asn-...-...-Asn-Asp-Asp-Gln-Tyr-Leu

Обращает на себя внимание тот факт, что при общем значительном различии N-концевых последовательностей остатки аспарагиновой кислоты (подчеркнутые в последовательностях) являются инвариантными для всех рассматриваемых протеиназ. В этом районе в структурах всех известных грибных протеиназ имеется участок с высоким содержанием аминокислот карбоновых кислот, отсутствующий у пепсина свиньи.

Строгая оценка распределения окрашенной метки между последовательностями А и В сложна, так как это можно сделать только после ферментативного гидролиза и хроматографического разделения окрашенных пептидов. При этом, однако, неизбежны неодинаковые потери пепти-

дов, особенно лабильного пептида А. Если брать средние данные по содержанию пептидов А и В во фракциях на начальных стадиях очистки, то на долю пептида А приходится ~ 75% метки, на долю пептида В — 25% метки. Такое же распределение включения ФАДК сохраняется и в белке, содержащем только 0,5 остатка карбодиимида на молекулу. Поскольку полная инактивация аспергиллопепсина А достигается при включении 1 остатка ФАДК, распределяющегося по двум карбоксильным группам, можно сделать вывод, что в ферменте функционально важен не только остаток аспарагиновой кислоты в последовательности, реагирующей с диазоацетильными ингибиторами, гомологичный Asp-215 в пепсине свиньи. Возможно, реагирующая с ФАДК дикарбоновая аминокислота в последовательности Asp-Glu вблизи N-концевого участка аспергиллопепсина А также играет важную функциональную роль. Однако этот вывод нельзя считать вполне строгим, так как он опирается только на косвенные данные по распределению метки между последовательностями А и В. Отметим, что реакция со второй карбоксильной группой не зависит от блокирования аспарагиновой кислоты диазоацетильным ингибитором. Ингибированный метиловым эфиром диазоацетилнорлейцина аспергиллопепсин А, в котором блокирована аспарагиновая кислота в последовательности А, при обработке 2-кратным избытком ФАДК включает 1 остаток карбодиимида, видимо присоединяющегося к последовательности В.

Пепсин свиньи, наиболее изученный представитель класса карбоксильных протеиназ, реагирует с ФАДК иначе, чем аспергиллопепсин А (табл. 1). Так, при обработке пепсина 2-кратным избытком окрашенного карбодиимида в молекулу фермента включается 1,5 остатка реагента, т. е. несколько больше, чем при модификации аспергиллопепсина А. Модифицированный пепсин сохраняет 68% активности, тогда как аспергиллопепсин А в тех же условиях полностью инактивируется. Полная инактивация пепсина не достигается даже при включении 6,5 остатка ФАДК, такой пепсин сохраняет 11—17% активности. Реакция окрашенного карбодиимида с пепсином в отличие от аспергиллопепсина А малоспецифична. Она затрагивает карбоксильные группы активного центра, о чем свидетельствует уменьшение протеолитической активности, но не столь избирательно, как в аспергиллопепсине А, а наряду с другими карбоксильными группами. Реакция ФАДК с пепсином и аспергиллопепсином А указывает на некоторое различие в строении активных центров этих ферментов. Можно предположить, что первоначально ФАДК быстро взаимодействует с карбоксильными группами активных центров обоих ферментов, образуя O-ацилизомочевину (см. схему). Дальнейшие пути превращения O-ацилизомочевины в пепсине и аспергиллопепсине А различны. В аспергиллопепсине А происходит быстрая внутримолекулярная перегруппировка в N-ацилмочевину (путь Б), которая блокирует активную карбоксильную группу. В пепсине O-ацилизомочевина наряду с перегруппировкой в N-ацилмочевину подвергается гидролизу (путь В), регенерируя активную карбоксильную группу, причем последний процесс преобладает.

Не все карбодиимиды инактивируют аспергиллопепсин А. N-Циклогексил-N'-(4-β-метилморфолинийэтил)карбодиимид не инактивирует фермент, тогда как N,N'-дициклогексилкарбодиимид действует так же, как и ФАДК [17]. Вероятно, структура карбодиимида оказывает влияние на избирательность реакции с аспергиллопепсином А.

Экспериментальная часть

Для работы использовали препарат карбоксильной протеиназы из *Asp. awamori* [18], N-фенилазофенил-N'-(γ-диметиламинопропил)карбодиимид, синтезированный нами [2], хроматографически очищенный свиной пепсин [19], гемоглобин крупного рогатого скота (препарат Ленин-

градского института вакцин и сывороток), сефарозу 4В с ковалентно связанным метиловым эфиром ϵ -аминокапронил-*L*-фенилаланил-*D*-фенилаланина [8]. УФ-спектры измеряли на спектрофотометре СФ-4А. Протеолитическую активность определяли по расщеплению гемоглобина [20].

Модификация аспергиллопепсина А ФАДК. Аналитический опыт. 4,84 мл водного раствора аспергиллопепсина А, содержащего 5 мг белка, помещали в стаканчик автоматического титратора ТТТ-1 (Дания), доводили рН до 5,6 прибавлением 0,1 М NaOH и добавляли при перемешивании 0,16 мл водного раствора ФАДК в 2% диметилформамиде (2-кратный избыток). Раствор ФАДК (0,75 мг/мл) готовили непосредственно перед проведением опыта. Реакцию продолжали при 20° в течение 1 ч, затем реакционную смесь наносили на колонку с сефадексом G-25 (1 × 25 см), промытую водой. Элюцию проводили водой с рН 5,6, собирая фракции, содержащие модифицированный белок. Количество остатков ФАДК, присоединившихся к аспергиллопепсину, рассчитывали по УФ-спектру, принимая ϵ_{325} равным 22 000, а ϵ_{280} равным 43 700.

$$\text{Число остатков ФАДК на моль белка} = \frac{D_{325} \cdot 1,99}{D_{290} - (D_{325} \cdot 0,328)}$$

Препаративный опыт. К 400 мг аспергиллопепсина А в 300 мл воды при рН 5,6 добавляли 12,8 мл раствора ФАДК (2-кратный избыток), перемешивали 1 ч при 20° и реакционную смесь подвергали геле-фильтрации на сефадексе G-25 (5 × 120 см), элюируя водой. Фракции, содержащие белок, лиофилизовали. Включение ФАДК составляло 1—1,1 остатка на молекулу белка. Выход 280 мг (70%).

Хроматография нативного и модифицированного аспергиллопепсина А на DEAE-целлюлозе (рис. 2). 25—30 мг модифицированного или нативного белка растворяли в 5 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,5, и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (2 × 15 см), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили градиентом концентрации NaCl от 0 до 1 М в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5,5, объем смеси 300 мл, скорость элюции 10 мл/ч.

*Хроматография на сефарозе 4 В с ковалентно связанным метиловым эфиром ϵ -аминокапронил-*L*-фенилаланил-*D*-фенилаланина.* 15 мг модифицированного или нативного аспергиллопепсина А растворяли в 5 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,5, и наносили на колонку с сефарозой 4 В с ковалентно связанным метиловым эфиром ϵ -аминокапронил-*L*-фенилаланил-*D*-фенилаланина (1 × 5 см), уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали 50 мл буфера и элюировали белок 1 М NaCl в буфере.

Ферментативный гидролиз и выделение окрашенных пептидов. 175 мг модифицированного аспергиллопепсина А растворяли в 25 мл 0,05 М Трис-буфера, рН 7,88, через 20 мин подкисляли раствор до рН 2,0 и добавляли 10 мг свиного пепсина. Гидролиз проводили в течение 6—24 ч при 24°. Гидролизат разделяли на колонке с сефадексом G-25 (2 × 100 см), элюируя водой (рис. 3). Окрашенная фракция I соответствовала негидролизованному белку. Пептидные фракции II и III ударивали в вакууме и подвергали дальнейшей очистке электрофорезом на бумаге Whatman 3 MM при рН 2,2 в системе муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (4 : 29 : 967), при рН 4,3 в системе пиридин — уксусная кислота — вода (2 : 4 : 994), при рН 5,6 в системе пирпидин — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 995) (табл. 2) и хроматографией в системе метилэтилкетон — трет-бутанол — вода (2 : 1 : 1). Пептиды с бумаги элюировали водой. Последовательность аминокислот в пептидах определяли методом Эдмана в сочетании с дансильрованием [21]. Дансилпроизводные аминокислот идентифицировали методом двумерной хроматографии на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (6 × 6 см) [22]. Аминокислотный анализ пептидов после гидролиза 5,7 н. HCl при 105° проводили на аминокислотном анализаторе KLA-3B-111.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoare D. G., Koshland D. E. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 2447—2453.
2. Балайдина Г. Н., Лысогорская Е. Н., Морозова Е. А., Степанов В. М. (1975) *Химия природн. соедн.*, 198—201.
3. Исаева Г. Г., Шиманская М. П., Степанов В. М., Балайдина Г. Н., Лысогорская Е. Н. (1974) Тезисы III Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов, с. 53, Киев.
4. Kovaleva G. G., Shimanskaya M. P., Stepanov V. M. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1075—1081.
5. Khorana H. G. (1953) *Chem. Rev.*, **53**, 145—166.
6. Carravay K. L., Koshland D. E. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **160**, 272—274.
7. Henberst H. B., Owen T. S. (1955) *J. Chem. Soc.*, 2668—2669.
8. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Адли К., Гончар М. И., Балайдина Г. Н., Славинская М. М., Стронгин А. Я. (1976) *Биохимия*, **41**, 294—303.
9. Азаренкова Н. И., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. (1976) *Биохимия*, **41**, 20—27.
10. Baylis R. S., Knowles J. R., Wydrant G. B. (1969) *Biochem. J.*, **113**, 377—386.
11. Meitner P. A. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 673—676.
12. Sodek J., Hofman T. (1970) *Can. J. Biochem.*, **48**, 1014—1016.
13. Tang J., Sepulveda R., Marcinisgu J., Chen K. C. S., Huang W.-K., Tao N., Lin D., Lanier J. P. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3437—3439.
14. Harris C. J., Kurosky A., Rao L., Hofmann T. (1972) *Proc. Biochem. Soc.*, **127**, 34—35.
15. Sepulveda P., Jackson K. W., Tang J. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **63**, 1106—1112.
16. Исаева Г. Г., Немцова Е. Р., Лысогорская Е. Н., Баратова Л. П., Белянова Л. П., Степанов В. М. (1976) Советско-американский симпозиум по химии и физике белка, с. 67, Рига.
17. Городецкий Д. И., Мясоедов Н. Ф., Степанов В. М. (1976) *Химия природн. соедн.*, 272—273.
18. Лобарева Л. С., Ковалева Г. Г., Шиманская М. П., Степанов В. М. (1972) *Биохимия*, **37**, 198—207.
19. Степанов В. М., Ваганова Т. И. (1963) *Биохимия*, **28**, 540—546.
20. Норгрон Д., Кушниц М., Херриот Р. (1950) Кристаллические ферменты, с. 299—301, Изд-во иностр. лит., М.
21. Grey W. R. (1972) in *Methods in Enzymol.*, pp. 121—138, Acad. Press, N. Y.—London.
22. Беленький В. Г., Гавкина Е. С., Прявильникова С. Р., Эрастов Д. П. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 181—189.

Поступила в редакцию
12.X.1976

COLOURED WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDE, A SPECIFIC INHIBITOR OF ASPERGILLOPEPSIN A

LYSOGORSKAYA E. N., BALANDINA G. N., STEPANOV V. M.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Reaction of coloured water-soluble carbodiimide, *N-p*-phenylazophenyl-*N'*-(γ -dimethylaminopropyl) carbodiimide (PADC), with aspergillopepsin A (*Asp. awamori* carboxylic proteinase) was studied at pH 5.6. It was found that one PADC residue was incorporated at PADC: enzyme ratio of 2 : 1 with concomitant complete inactivation of aspergillopepsin A. Analysis of peptic hydrolysate revealed that PADC reacted with aspartic acid residue in the sequence Ile-Ala-Asp-Thr-Gly (sequence A) and ω -carboxyl of dicarboxylic amino acid residue in the sequence Asx-Asx-Glx (sequence B). The sequence A is homologous to those from the active sites of some carboxylic proteinases. The sequence B is thought to belong to the N-terminal part of aspergillopepsin A peptide chain (residues 13-15) and to be of functional importance. PADC is very specific reagent for aspergillopepsin A modification, however it proved to be rather non-specific when applied to swine pepsin which may be indicative of the differences in the active site structure of these enzymes.