



УДК 577.156.2

ЩЕЛОЧНАЯ МЕЗЕНТЕРИКОПЕПТИДАЗА: ЗАВИСИМОСТЬ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ГИДРОЛИЗА ОТ pH ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Таран-Доровска В. Н., Райкова Д. Ш., Благоев Б. М.

Институт органической химии Болгарской Академии наук,
Медико-биологический институт Медицинской Академии, София, Болгария

Из pH-зависимости константы второго порядка $k_{\text{кат}}/K_{\text{m(каж)}}$ и $k_{\text{кат}}$ для гидролиза метилового эфира α -N-ацетил-L-фенилаланина, катализируемого щелочной мезентерикопептидазой, определены pK_a ионизирующих групп активного центра при 25°, для свободного фермента (pK_a $7,00 \pm 0,08$) и фермент-субстратного комплекса (pK_a $7,01 \pm 0,05$), а из температурной зависимости константы ионизации вычислены теплоты ионизации ΔH_i $9,1 \pm 0,8$ ккал/моль и $\Delta H_i'$ $7,8 \pm 0,6$ ккал/моль. Полученные близкие значения константы ионизации и теплот ионизации показывают, что одна и та же ионогенная группа (по всей вероятности, имидазольное кольцо гистидина) обнаруживается в свободном ферменте и фермент-субстратном комплексе. В исследованном интервале значений pH (5,0—9,0) $K_{\text{m(каж)}}$ не зависит от pH. Следовательно, ионогенные группы, контролирующие ферментативную активность, входят в состав каталитического центра.

Объектом настоящего исследования является фермент щелочная мезентерикопептидаза (КФ 3.4.4), выделенная из штамма *Bacillus mesentericus*. На основании данных по необратимому ингибированию диизопропилфторфосфатом эта протеаза отнесена к группе сериновых бактериальных протеаз [1]. Известно, что некоторые сериновые протеазы (α -химотрипсин, трипсин, эластаза, субтилизин и др.) содержат в активном центре остаток гистидина, поэтому естественно было проверить, есть ли такой остаток в активном центре мезентерикопептидазы.

Одним из наиболее легко доступных методов, дающих информацию о характере ионогенных групп активного центра, является анализ зависимости параметров ферментативной реакции от pH. В литературе описаны зависимости гидролиза субстратов мезентерикопептидазой [2,3] и ингибирования алкилборными кислотами от pH [4]. М. Шоповой и Н. Геновым изучено влияние pH на фотоокисление фермента. Результаты этих исследований, которые скоро будут опубликованы, указывают на наличие в каталитическом центре фермента ионогенной группы с pK_a 6,6—7,3. Авторы считают, что это, вероятно всего, остаток гистидина.

Однако в ферментах из-за сложного микроокружения в активном центре существует возможность смещения значения pK для данной ионогенной группы на несколько единиц по сравнению с значением pK модельной системы. В последнее время при помощи физических методов определены значения pK для некоторых ферментов, которые сильно отличаются от значений pK , найденных кинетическими методами [5—8]. Например,

Кинетические параметры гидролиза метилового эфира
 α -N-ацетил-L-фенилаланина по действию щелочной мезентерикопептидазы

Температура, °C	pH	K_m (каж) · 10 ³ , M	$k_{кат}$, с ⁻¹	pK_a'	Температура, °C	pH	K_m (каж) · 10 ³ , M	$k_{кат}$, с ⁻¹	pK_a'
12,0	5,00	4,20	0,67	7,28±0,04	25,0	6,50	2,63	55,0	7,01±0,05
	6,00	3,60	6,50			7,00	2,50	95	
	7,00	2,70	42,0			7,50	2,08	170	
	8,00	2,80	102			8,00	2,35	210	
	9,00	3,23	126			8,50	2,62	218	
19,0	5,00	2,41	1,0	7,14±0,06	30,2	9,00	2,48	230	6,93±0,06
	6,00	2,60	13,0			9,50	2,50	223	
	7,00	2,20	69,0			5,00	3,08	3,68	
	8,00	2,28	154			6,00	2,15	32,5	
	9,00	2,40	170			7,00	2,50	145	
25,0	5,00	2,46	2,20	7,01±0,05		8,00	2,63	296	
	5,50	2,22	6,10			9,00	2,68	306	
	6,00	2,32	21,2			9,50	2,46	317	

Примечание. Значения pK_a' получены из наклона прямых в координатах $k_{кат}$, $k_{кат}/[H^+]$ методом наименьших квадратов.

Таблица 2

Теплота ионизации гистидина в активном центре различных протеаз

Фермент	Химотрипсин	Трипсин	Субтилизин <i>Carlsberg</i>	Щелочная протеаза из <i>Asp. oryzae</i>	Щелочная протеаза из <i>Asp. flavus</i>	Щелочная мезентерикопептидаза
$\Delta H_i'$, ккал/моль	7,1 [10] 7,0 [12]	7,0 [13]	7,3 [14]	9,1 [15]	7,5 [16]	7,8

Хункапиллер и сотр. [5] методом ЯМР доказали, что в бактериальной протеазе при pH 6,8 титруется не His-57, как принято считать, а карбоксильная группа Asp-102, также входящая в каталитический центр фермента. В этом случае His-57 протонируется при pH ниже 4,0. Следовательно, значение pK_a Asp-102 смещается на 3—4 единицы в щелочную зону, а pK_a His-57 понижается на 3 единицы. Аналогичные результаты получили Коэппе и Струд [6] для остатка аспарагиновой кислоты в активном центре трипсина. Вообще значение pK , близкое к нейтральному, можно отнести как к карбоксильной (pK 3—4 [9], 6,8 [5, 6]), имидазольной (pK 4 [5], 5,6—7,3 [9, 10]) или α -аминогруппе (pK 7,6—8,4 [9]), так и к изменению скоростьопределяющей стадии, а не к ионизации какой-либо группы [11]. Вот почему определение группы активного центра на основании определения значений pK не является однозначным.

Дополнительным критерием в этом отношении является определение теплоты ионизации каталитически активной функциональной группы. В данной работе исследована температурная зависимость константы ионизации и по уравнению Вант-Гоффа определено значение теплоты ионизации ΔH_i .

Анализ гидролиза метилового эфира α -N-ацетил-L-фенилаланина под действием щелочной мезентерикопептидазы показывает (табл. 1) простую сигмоидальную зависимость $k_{кат}$ от pH для четырех температур в интервале значений pH 5,0—9,0. Это свидетельствует о том, что в исследованных интервалах pH и температур не наступает изменения в скоростьопределяющей стадии и поэтому точка перегиба обусловлена ионизацией ионогенной группы [11].

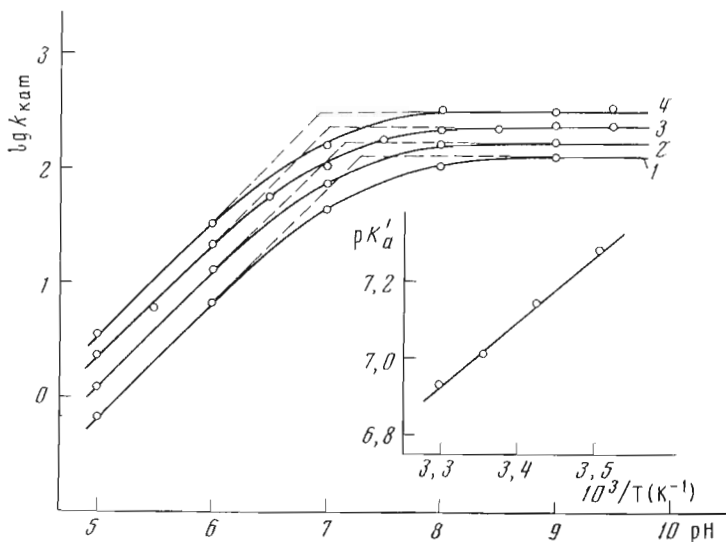


Рис. 1. Зависимость $k_{\text{кат}}$ гидролиза метилового эфира α -N-ацетил-L-фенилаланина под действием щелочной мезентерикопептидазы от pH при температуре ($^{\circ}\text{C}$): 1 — 12; 2 — 19; 3 — 25; 4 — 30,2. Кривые теоретические, вычислены по формуле $k_{\text{набл}} = k_{\text{незав}} / (1 + [\text{H}^+] / K'_a)$, где $k_{\text{незав}}$ и K'_a определены из отрезка и наклона прямой в координатах $k_{\text{кат}}$, $k_{\text{кат}} / [\text{H}^+]$. \circ — экспериментальные значения. На вставке зависимость pK'_a от обратной температуры

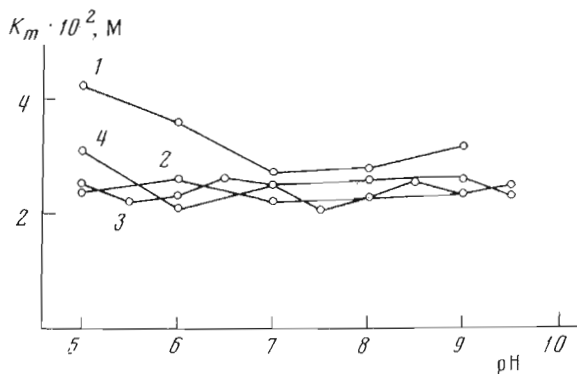


Рис. 2. Зависимость от pH и температуры K_m (каж) для гидролиза метилового эфира α -N-ацетил-L-фенилаланина под действием щелочной мезентерикопептидазы при температуре ($^{\circ}\text{C}$): 1 — 12; 2 — 19; 3 — 25; 4 — 30,2

Из данных по зависимости $\log k_{\text{кат}}$ от pH при 25° получено значение pK'_a $7,01 \pm 0,05$. С увеличением температуры значения pK'_a уменьшаются (рис. 1). Вычисленное из этой зависимости значение теплоты ионизации $\Delta H_i'$ $7,8 \pm 0,6$ ккал/моль хорошо согласуется с данными Коуна и Эдсала [9] для теплоты ионизации имидазола в белках (6,9—7,5 ккал/моль) и с теплотами ионизации других сериновых протеаз (табл. 2). Найденную нами теплоту ионизации нельзя отнести к карбоксильной группе, так как существующие в литературе значения ΔH_i для этой группы существенно ниже ($\pm 1,5$ [9] — 3,5 ккал/моль [17]). Предположение Коэппе и Строуда [6], что ответственная за катализ ионизирующая группа как в α -химотрипсине, так и в других сериновых протеазах является карбоксильной группой, вряд ли можно считать убедительным, так как многочисленные экспериментальные значения ΔH_i на несколько ккал/моль выше, чем эта

величина для карбоксильной группы. Так же трудно отнести это значение к α -аминогруппе (ΔH_i 10—13 ккал/моль [9]). Следовательно, наиболее вероятной каталитически активной ионогенной группой является остаток гистидина. Для более строгого доказательства участия в катализе имидазольной группы мы провели химическую модификацию хлорметилкетонами, что будет предметом следующего сообщения.

В исследованном интервале значений pH (5,0—9,0) $K_{m(\text{каж})}$ остается постоянным (рис. 2). Это означает, что ионогенных групп в сорбиционном участке нет и, по всей вероятности, фермент-субстратное взаимодействие имеет гидрофобный характер.

Зависимость константы второго порядка $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$ от pH дает константу ионизации ионогенных групп активного центра свободного фермента. Найденная нами зависимость $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$ от pH при различных температурах имеет тот же вид, что и зависимость $k_{\text{кат}}$ от pH. При 25° для свободного фермента получено значение pK_a $7,00 \pm 0,08$, а для теплоты ионизации ΔH_i $9,1 \pm 0,8$ ккал/моль. Близкие значения констант ионизации и теплот ионизации для свободного и субстратсвязанного фермента показывают, что одна и та же ионогенная группа, по-видимому имидазольное кольцо гистидина, определяет активность свободного и субстратсвязанного фермента и что ферментативная реакция не сопровождается существенными конформационными изменениями.

Экспериментальная часть

В качестве субстрата использовали метиловый эфир α -N-ацетил-L-фенилаланина, который является специфическим субстратом с высокой константой специфичности $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$ $9000 \text{ с}^{-1}\text{M}^{-1}$. Этот субстрат синтезировали по методике [18]. Т. пл. 90°, $[\alpha]_D^{25} +16^\circ$ (с 1, метанол), т. пл. 90° $[\alpha]_D^{25} +17,8^\circ$ (с 1, метанол) [18].

Фермент, щелочную мезентерикопептидазу, выделяли по методике Караджовой и согр. [1]. Запасные растворы фермента готовили в 0,7 М CaCl_2 . Концентрацию активного фермента определяли методом титрования активных центров N-транс-циннамоилимидазолом [19]. Скорость ферментативного гидролиза определяли в 0,1 М KCl на pH-стате Radiometer ТТТ-11в (pH-метр 26, микробюретка тип SBU1а, снабженная термостабируемой реакционной ячейкой, покрытой с внешней стороны толстым слоем теплоизоляционного материала).

Общий объем реакционной смеси 6 мл. Концентрацию субстрата меняли в пределах от $3,33 \cdot 10^{-3}$ до $8,34 \cdot 10^{-3}$ М, концентрацию фермента — от $2,68 \cdot 10^{-8}$ до $1,64 \cdot 10^{-6}$ М, а концентрацию КОН — от $4,95 \cdot 10^{-3}$ до $4,95 \cdot 10^{-2}$ н. Кинетические константы, $K_{m(\text{каж})}$ и V определяли графически по методу Лайнуивера — Бэрка, а из значений V находили $k_{\text{кат}} = V/[E_0]$, где $[E_0]$ — концентрация активного фермента в реакционной смеси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Караджова М., Бакарджиева А., Велчева П. (1970) Докл. Болг. АН, 23, 431—434.
2. Генев Н., Велчева П., Караджова М. (1971) Изв. Отд. хим. науки, Бълг. АН, IV, кв. 4, 637—641.
3. Genov N., Shopova M. (1974) Int. J. Pept. Prot. Res., 6, 347—351.
4. Rotanova T., Ivanova A., Antonov V., Rakadjieva A., Blagoev B. (1976) Int. J. Pept. Prot. Res., 8, 225—231.
5. Hunkapiller M., Smallcombe St., Whitaker D., Richards J. (1973) Biochemistry, 12, 4732—4743.
6. Koeppel R., Stroud R. (1976) Biochemistry, 15, 3450—3458.
7. Markley J., Porubcan M. (1976) J. Mol. Biol., 102, 487—509.
8. Markley J. (1975) Accounts Chem. Res., 8, 70—80.
9. Cohn E., Edsall J. (1943) Proteins amino acids and peptides as ions and dipolar ions, p. 445, Reinhold Publ. Corp., New York.

10. Доровска В., Варфоломеев С., Мартинек К. (1973) Биохимия, 38, 381—392.
11. Bender M., Clement G. (1963) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 12, 339—344.
12. Fife T., Milstien J. (1967) Biochemistry, 6, 2901—2907.
13. Gutfreund H. (1955) Trans. Faraday Soc., 51, 441—445.
14. Glazer A. (1967) J. Biol. Chem., 242, 433—436.
15. Her Ching Ku, Wyborny L., Kaluitsky G. (1972) Biochim. et biophys. acta, 268, 225—232.
16. Turková J. (1970) Biochim. et biophys. acta, 220, 624—627.
17. Parsons S., Raftery M. (1972) Biochemistry, 11, 1630—1633.
18. Jones J., Nieman C. (1963) Biochemistry, 2, 498—514.
19. Bender M., Kezdy F., Gunter C. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3714—3721.

Поступила в редакцию
21.III.1977

ALKALINE MESENTERICOPEPTIDASE: pH-DEPENDENCE OF KINETIC PARAMETERS AT DIFFERENT TEMPERATURES

§TARAN-DOROVSKA V. N., RAYKOWA D. P., BLAGOEV B. M.

*Institute of Organic Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences;
Medico-Biological Institute, Academy of Medicine, Sofia, Bulgaria*

The pH-dependence of the second order rate constant $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}(\text{app})}$ and k_{cat} for the hydrolysis of α -N-acetyl-L-phenylalanine methyl ester catalyzed by alkaline mesentericopeptidase and the pK_a values of ionizable groups in the active site of free enzyme (pK_a 7.00 ± 0.08 , 25°) and enzyme-substrate complex (pK_a' 7.01 ± 0.05 ; 25°) were determined. From the temperature dependence of the ionization constants the heats of ionization were calculated (ΔH_i 9.1 ± 0.8 kcal/mole and $\Delta H_i'$ 7.8 ± 0.6 kcal/mole, respectively). The similar values for the ionization constants and heats of ionization indicated that the same ionogenic group, most probably the imidazole ring of histidine, was detected in free enzyme and enzyme-substrate complex. The $K_{\text{m}(\text{app})}$ was found to be pH-independent over the pH-range studied (5.0-9.0). It allows to attribute the ionogenic groups controlling the enzymatic activity to the catalytic rather than binding site.