



УДК 577.156.2

СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА *n*-НИТРОАНИЛИДОВ ПЕПТИДОВ — ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ СУБТИЛИЗИНА

Якушева Л. Д., Люблинская Л. А., Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Синтезировали два хромогенных пептидных субстрата субтилизина: *n*-нитроанилиды Z-Gly-Pro-Leu и Z-Ala-Pro-Leu. Определены кинетические параметры гидролиза субтилизином ряда синтетических пептидных субстратов: *n*-нитроанилидов Z-Gly-Gly-Leu, Z-Ala-Ala-Leu, Z-Gly-Gly-Phe, Z-Ala-Ala-Phe, Z-Ala-Leu, Z-Gly-Pro-Leu и Z-Ala-Pro-Leu. Показано, что субтилизин проявляет высокую специфичность к фенилаланину, находящемуся в положении P_1 , и к аланину в положениях P_2 и P_3 .

Субтилизины — сериновые протеиназы бактериального происхождения. Изучение катализируемого ими гидролиза синтетических и природных субстратов показало, что с наибольшей скоростью расщепляются пептидные связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот (лейцин, фенилаланин и тирозин) [1,2].

Данная работа посвящена синтезу пептидных субстратов, продолжающих ряд ранее полученных [3], и изучению кинетических характеристик их гидролиза субтилизином.

В работе был использован субтилизин типа BPN' (Novo), полученный с помощью аффинной хроматографии из коммерческого препарата фирмы Serva на сефарозе 4В с ковалентно присоединенным амидом ϵ -аминокапронил-аланил-аланил-*D*-лейцина [4].

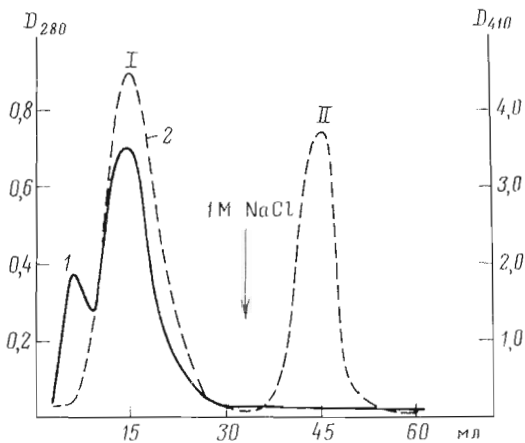
При хроматографии препарат субтилизина разделился на два компонента (рисунок). Первый из них представлял собой собственно субтилизин, очищенный от балластных белков. Второй компонент обладал высокой протеолитической активностью и, следовательно, искажал кинетические константы гидролиза субстратов субтилизином, поэтому его отделение оказалось необходимым для данной работы. Свойства этого компонента будут рассмотрены особо.

Для всех исследованных субстратов начальная скорость гидролиза является линейной функцией концентрации фермента и подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен.

Высокий коэффициент молярной экстинкции *n*-нитроанилина ($\epsilon_{410} = 8900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [5]) позволяет определять скорость гидролиза с удовлетворительной точностью.

Константы Михаэлиса $K_{m(\text{каж})}$ и $k_{\text{кат}}$, вычисленные по методу Лайнуивера — Берка, приведены в таблице.

Сокращения: —HNPhNO₂ — *n*-нитроанилид; DCC — N,N'-дихлоргексилкарбодиимид, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты, кроме указанной особо, L-ряда.



Аффинная хроматография субтилизина А на сефарозе 4В, содержащей амид ϵ -аминокапроил-аланил-аланил-*D*-лейцина. Начало элюции 1 М NaCl в 0,01 М боратном буфере, pH 8,5, показано стрелкой. 1 — оптическая плотность элюата при 280 нм, 2 — оптическая плотность *n*-нитроанилина при 410 нм, характеризующая протеолитическую активность. Пик I — субтилизин ВРН', пик II — второй компонент

Все семь изученных *n*-нитроанилидов пептидов, как видно из таблицы, имеют значения K_m (как) не более 2 мМ. Лучшим из субстратов по кинетическим параметрам оказался Z-Ala-Ala-Phe-HNPhNO₂. Замена фенилаланина на лейцин в положении P_1 ухудшает субстратные свойства пептида [соединения (I) и (III), (II) и (IV) в таблице] — значение $k_{кат}/K_m$ для Z-Gly-Gly-Leu-HNPhNO₂ (I) в 2 раза меньше, чем для Z-Gly-Gly-Phe-HNPhNO₂ (III), а для Z-Ala-Ala-Leu-HNPhNO₂ (II) в 11 раз меньше, чем для Z-Ala-Ala-Phe-HNPhNO₂ (IV).

Вторичная специфичность субтилизина к аланину проявляется при парном сравнении трипептидов. Если положение P_1 занимает лейцин, то переход от глицина к аланину в положениях P_2 и P_3 сопровождается увеличением $k_{кат}/K_m$ в 6 раз [соединения (I) и (II) в таблице]. При аналогичной замене глицина на аланин в субстратах с фенилаланином в P_1 [соединения (III) и (IV) в таблице] это отношение возрастает в 33 раза.

Сравнение кинетических характеристик первых четырех пептидных субстратов показывает, что субтилизин более специфичен к фенилаланину, чем к лейцину, расположенному в положении P_1 , и что лучшими субстратами являются те пептиды, у которых в положениях P_2 и P_3 находится аланин.

Субстраты, у которых в положении P_2 расположен пролин [соединения (VI) и (VII) в таблице], значительно хуже гидролизуются субтилизинном. Причем активность фермента по Z-Ala-Pro-Leu-HNPhNO₂ (VII) примерно вдвое больше, чем по Z-Gly-Pro-Leu-HNPhNO₂ (VI), что является результатом влияния аланина в положении P_3 .

Кроме природы аминокислотных остатков для гидролиза субстратов существенна и длина пептидной цепочки [6]. Переход от трипептида Z-Ala-Ala-Leu-HNPhNO₂ (II) к дипептиду Z-Ala-Leu-HNPhNO₂ (V) уменьшает отношение $k_{кат}/K_m$ в 8,5 раз.

Если сравнить между собой Z-Gly-Gly-Leu-HNPhNO₂ (I) и Z-Ala-Leu-HNPhNO₂ (V), то окажется, что они очень близки по своим кинетическим константам. Это, безусловно, свидетельствует о вторичной специфичности фермента к аланину в субстрате Z-Ala-Leu-HNPhNO₂ (V). Сходное отношение субтилизина к этим субстратам позволяет использовать дипептид для определения протеолитической активности фермента в лабораторной практике.

Кинетические параметры гидролиза пептидных субстратов субтилизином BPN'

Субстрат	P_1 - P_2 - P_3 - P_1 - P_1	$[S] \cdot 10^3, M$	$[E] \cdot 10^6, M$	$K_M \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$\frac{k_{кат}}{K_M} \cdot 10^3, M^{-1} \cdot c^{-1}$
(I)	Z-Gly-Gly-Leu-HNPhNO ₂	0,4-2,0	1,7-5,0	1,10±0,06	0,20±0,03	180
(II)	Z-Ala-Ala-Leu-HNPhNO ₂	0,1-0,5	0,1-0,5	0,55±0,05	0,60±0,06	1100
(III)	Z-Gly-Gly-Phe-HNPhNO ₂	0,2-2,0	0,4-1,0	0,83±0,02	0,30±0,04	360
(IV)	Z-Ala-Ala-Phe-HNPhNO ₂	0,1-0,53	0,12-0,24	0,071±0,007	0,88±0,03	12000
(V)	Z-Ala-Leu-HNPhNO ₂	1,0 4,4	0,5-0,8	1,1±0,4	0,13±0,06	130
(VI)	Z-Gly-Pro-Leu-HNPhNO ₂	0,9-4,6	0,75-5,25	2,00±0,05	0,675±0,004	37
(VII)	Z-Ala-Pro-Leu-HNPhNO ₂	0,9-3,6	0,5-2,4	1,40±0,01	0,12±0,01	85

Полученные результаты согласуются с известными кинетическими характеристиками трипептидных синтетических и природных субстратов субтилизина [2,7], а также с результатами рентгеноструктурных исследований по связыванию модельных ингибиторов субтилизином [8]. Согласно этим данным, при образовании комплекса Михаэлиса между ферментом и пептидной частью ингибитора устанавливается гидрофобный контакт с боковой цепью аминокислоты в положении P_1 и образуется система водородных связей с остатками аминокислот в положениях P_2 и P_3 , вследствие чего важны как размер, так и ориентация боковых цепей в положениях P_2 и P_3 .

Кинетические параметры субстратов, содержащих пролин, сравнимы с данными венгерских авторов [9], полученными для *n*-нитроанилидов трипептидов и субтилизина Novo (относящегося к тому же типу, что и BPN') при pH 8,4 и 37°. Пептиды Z-Asp-Pro-Leu-HNPhNO₂ и Z-Lys-Pro-Leu-HNPhNO₂, например, имеют K_M и $k_{кат}$ $2,0 \cdot 10^{-3}$ М и $0,28$ с⁻¹, $1,5 \cdot 10^{-3}$ М и $0,13$ с⁻¹ соответственно [9].

Хотя Z-Ala-Ala-Phe-HNPhNO₂ (IV) лучше других синтезированных субстратов субтилизина по кинетическим параметрам, низкая растворимость этого соединения в водных буферах препятствует применению его для определения протеолитической активности субтилизинов. Для этой цели более удобны пептиды Z-Ala-Ala-Leu-HNPhNO₂ (II), Z-Gly-Gly-Leu-HNPhNO₂ (I) и Z-Ala-Leu-HNPhNO₂ (V), который более доступен, чем трипептидные субстраты.

Применение серии *n*-нитроанилидов пептидов особенно важно при характеристике новых ферментов, родственных субтилизину, например внутриклеточных сериновых протеиназ бактерий [10].

Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках марки Silufol в системах: пиридин-*n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 15 : 10 : 12 : 3 (А); метанол — хлороформ, 1 : 9 (Б); хлороформ — уксусная кислота — метанол — петролейный эфир (70—90°), 45 : 5 : 5 : 5 (В). Оптическую активность измеряли на поляриметре МА-511-0 (Hilger-Watts, Англия). Кислотный гидролиз проводили в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 105°, 22 ч), после чего аминокислотный состав определяли с помощью автоматического анализатора Unichrom (Beckman, Австрия).

В работе использовали субтилизин (субтилопептидаза А, КФ 3.4.4.16; Serva, ФРГ), *n*-нитроанилид лейцина (Serva, ФРГ). Синтез субстратов (I)—(V) описан ранее [3]. Сорбент для аффинной хроматографии получа-

ли присоединением амида ϵ -аминокапронил-аланил-аланил-*D*-лейцина к активированной бромцианом сефарозе 4В [4].

Z-Gly-Pro-Leu-HNPhNO₂ (VI). К раствору 0,306 г (1 ммоль) бензилоксикарбонил-глицил-пролина [11], 0,251 г (1 ммоль) *n*-нитроанилида лейцина и 0,115 г (1 ммоль) *N*-оксисукцинимид в 8 мл сухого DMF при -15° прибавляли 0,206 г (1 ммоль) ДСС. Перемешивали 1,5 ч при 0° и оставляли перемешиваться при 4° на ночь. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в 50 мл этилацетата и промывали последовательно 10 мл воды, 0,5 М NaHCO₃ (2 × 10 мл), водой (1 × 10 мл), 0,5 н. HCl (2 × 10 мл), водой (2 × 10 мл), сушили над сульфатом натрия. Выход 0,394 г (73%), т. пл. 141–143°, R_f 0,81 (А); 0,65 (В); 0,75 (В); $[\alpha]_D -19,5^\circ$ (с 1; DMF). Аминокислотный состав: Gly — 1,00, Pro — 0,99, Leu — 0,98.

Z-Ala-Pro-Leu-HNPhNO₂ (VII). Получен аналогично из бензилоксикарбонил-аланил-пролина [12] и *n*-нитроанилида лейцина. Выход 68%, т. пл. 102°; R_f 0,86 (А), 0,86 (В), 0,92 (В); $[\alpha]_D -55,6^\circ$ (с 1; DMF). Аминокислотный состав: Ala — 1,00; Pro — 1,08; Leu — 0,94.

Аффинная хроматография субтилизина А. Растворяли 5 мг субтилизина в 1 мл 0,01 М боратного буфера, pH 8,5, содержащего 1 mM CaCl₂. На колонку (1 × 5 см) с сефарозой 4В, содержащей амид ϵ -аминокапронил-аланил-аланил-*D*-лейцина, наносили 0,9 мл раствора фермента и элюировали 0,01 М боратным буфером, pH 8,5, с 1 mM CaCl₂, собирая фракции по 3 мл. Скорость элюции 18 мл/ч. Содержание белка определяли по поглощению при 280 нм. Протеолитическую активность определяли по *n*-нитроанилиду *N*-бензилоксикарбонил-глицил-глицил-лейцина описанным способом [3].

Кинетика гидролиза субстратов. Измерение начальных скоростей ферментативного гидролиза *n*-нитроанилидов пептидов осуществляли спектрофотометрированием реакционных растворов при 410 нм с помощью регистрирующего спектрофотометра Аста М-VI (Вескман, Австрия) на шкале 0,1 ОЕ при ширине щели 3 мм. В две кварцевые кюветы (l 1 см) вносили по 2,4 мл раствора субстрата в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 8,5), содержащем 15% DMF, выдерживали 5–7 мин при 37° в термостатированной кювете прибора, затем в первую кварцевую кювету (контрольный раствор) добавляли 0,01 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (pH 8,5), а во вторую — 0,01 мл раствора субтилизина в том же буфере. Для каждой концентрации субстрата ставили 5–7 отдельных опытов, из этих опытов рассчитывали среднеарифметическое значение скорости гидролиза, которое использовали для вычисления $K_{m(наж)}$. Кинетические параметры гидролиза *n*-нитроанилидов пептидов определены по методу наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morihara K., Tsuzuki H. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., **129**, 620–634.
2. Morihara K., Tsuzuki H. (1970) (Arch. Biochem. and Biophys., **138**, 515–525.
3. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. (1977) Биоорган. химия, **3**, 273–279.
4. Якушева Л. Д., Люблинская Л. А., Степанов В. М. (1976) Тезисы III Всесоюзного симпозиума «Структура и функции активных центров ферментов», с. 26.
5. Ljublinskaya L. A., Belyaev S. V., Strongin A. Ya., Matyash L. F., Levin E. D., Stepanov V. M. (1974) Anal. Biochem., **62**, 371–376.
6. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. (1969) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **35**, 210–214.
7. Blackburn W., Bilton R. F., Crumpton M. J., Law H. D. (1973) FEBS lett., **34**, 333–337.
8. Robertus J. D., Alden R. A., Birktoft J. J., Kraut J., Powers J., Wilcox P. E. (1972) Biochemistry, **11**, 2439–2442.
9. Pozsgay M., Gaspar R., Elodi P., Bajusz S. (1977) FEBS lett., **74**, 67–70.
10. Изотова Л. С., Городецкий Д. И., Янонис В. В., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Тимохина Е. А., Стронгин А. Я., Степанов В. М. (1978) Биоорган. химия, **4**, 397–403.

11. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M., (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1839—1842.
12. Gerig J. T., McLeod R. S. (1976) J. Org. Chem., 41, 1653—1655.

Поступила в редакцию
18.V.1978

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE *p*-NITROANILIDES, SUBTILISIN CHROMOGENIC SUBSTRATES

YAKUSHEVA L. D., LJUBLINSKAYA L. A., STEPANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

Two new chromogenic substrates, Z-Gly-Pro-Leu and Z-Ala-Pro-Leu *p*-nitroanilides were synthesized. The kinetic parameters for the subtilisin-catalyzed hydrolysis of the following synthetic peptide substrates — Z-Gly-Gly-Leu-, Z-Ala-Ala-Leu-, Z-Gly-Gly-Phe-, Z-Ala-Ala-Phe-, Z-Ala-Leu-, Z-Gly-Pro-Leu-, and Z-Ala-Pro-Leu *p*-nitroanilides were determined. The evidence was obtained that subtilisin possesses high specificity towards phenylalanine in P_1 and to alanine — in P_2 and P_3 positions.
