



УДК 577.156.02

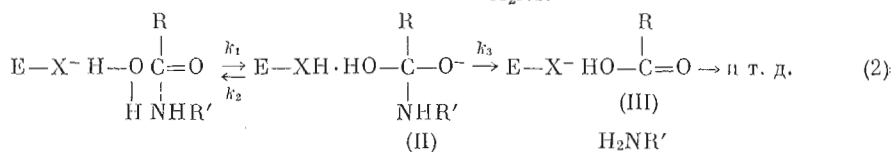
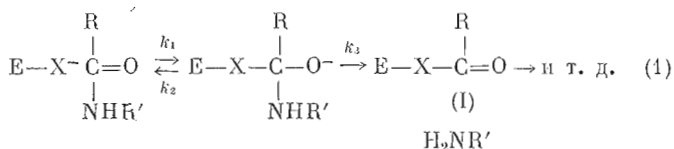
МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗОЙ

*Антонов В. К., Явашев Л. П., Волкова Л. И.,
Садовская В. Л., Гинодман Л. М.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Лейцинаминопептидаза (КФ 3.4.11.1) катализирует гидролитическое отщепление N-концевых аминокислот в пептидах и белках. Это весьма эффективный (число оборотов по лейцинамиду превышает $1 \cdot 10^6 \text{ мин}^{-1}$ [1]) Zn^{2+} -содержащий фермент, механизм каталитической активности которого еще очень мало изучен.

Как и для всех гидролаз, для этого фермента возможны два основных механизма расщепления амидной связи: нуклеофильный (1) и общий основной (2) катализ:

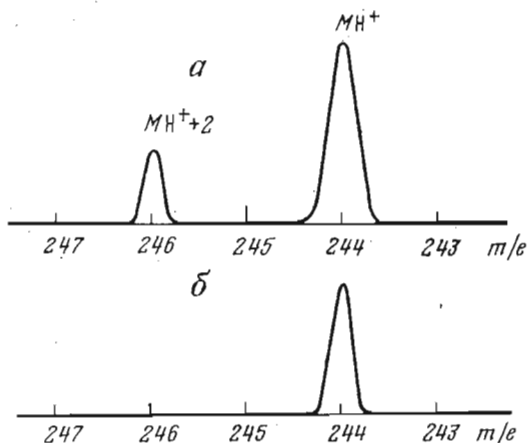


Выбор между этими двумя механизмами стало возможным сделать, пользуясь разработанным нами ранее методом, хорошо зарекомендовавшим себя при исследовании каталитического механизма пепсина [2, 3]. Метод основан на изучении включения тяжелого изотопа кислорода ^{18}O из H_2^{18}O в продукт транспептидации, а также в непрореагировавший субстрат.

Лейцинаминопептидаза из хрусталика глаза быка катализирует транспептидацию по типу ацильного переноса (3) [4]:



Очевидно, что если промежуточным соединением в этой реакции (а следовательно, и в реакции гидролиза) является «ацил-фермент» (I, схема 1), то включение ^{18}O из H_2^{18}O в пептидную группу продукта транспептидации невозможно, так как вода не участвует в этом процессе. Если же механизм гидролиза включает образование нековалентного промежуточного соединения (III, схема 2), т. е. вода участвует на первой



Масс-спектры H-Leu-Leu-NH₂: а — образец из опыта, б — модельное соединение. Снято на приборе Varian MAT

стадии процесса, продукт транспептидации должен включать ¹⁸O. Исследование включения ¹⁸O в непрогидролизированный субстрат дает дополнительную информацию о процессе, причем степень обмена будет зависеть от соотношения скоростей распада промежуточного тетраэдрического соединения (II) в направлении исходного субстрата (*k*₂) и продуктов реакции (*k*₃).

Мы исследовали включение ¹⁸O из H₂¹⁸O в лейцинамид и лейциллейцинамид в ходе реакций гидролиза лейцинамида и транспептидации, катализируемых лейцинаминопептидазой (из хрусталика глаза быка), а также изучали переход метки ¹⁸O из предварительно меченного лейцинамида в лейциллейцинамид при проведении реакции в обычной (H₂¹⁶O) воде. Опыты проводили в 0,05 М трис-НСl-буфере при рН 8,5 и температуре 22° С, используя кристаллическую гомогенную лейцинаминопептидазу ([*E*]₀ 5 · 10⁻⁷ М), тяжелоокислородную воду 62 ат. % обогащения или лейцинамид, содержащий 67 ат. % избытка ¹⁸O. Концентрация субстрата составляла 0,3 М. Фермент дополнительно не активировали. Для остановки реакции смесь быстро замораживали при -70° С и лиофилизовали. Разделение компонентов осуществляли на бумаге Watmann 3 ММ в системе *n*-бутанол — вода — муравьиная кислота (8 : 1 : 1). Зоны, соответствующие лейциллейцинамиду и лейцинамиду, вырезали, элюировали 0,1 М уксусной кислотой и дополнительно очищали на сефадексе G-10.

Содержание ¹⁸O в обоих образцах определяли масс-спектрометрически на приборе Varian MAT CN-5, используя метод полевой ионизации. Измеряли величину пиков ионов [MN]⁺ и [MN+2]⁺ и содержание ¹⁸O рассчитывали по формуле

$$[^{18}\text{O}] = \frac{[\text{MN} + 2]^+}{[\text{MN}]^+ + [\text{MN} + 2]^+} \cdot 100, \text{ ат. \% (см. рисунок).}$$

Полученные данные (таблица) показывают, что в пептидную группу продукта транспептидации включается кислород воды, причем на его

| Субстрат | Содержание ¹⁸ O, ат. % | | Время инкубации, мин | Анализируемое соединение | Содержание ¹⁸ O в анализируемом соединении, ат. % | Степень включения, % |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|
| | в субстрате | в H ₂ O | | | | |
| H-Leu-NH ₂ | 0,2 | 62 | 2 | H-Leu-Leu-NH ₂ | 29 | 46 |
| H-Leu-NH ₂ | 0,2 | 62 | 17* | H-Leu-NH ₂ | 31,5 | 50 |
| H-[¹⁸ O]Leu-NH ₂ | 67 | 0,2 | 2 | H-Leu-Leu-NH ₂ | 30 | 55 |

* Степень гидролиза субстрата 80%.

долю приходится ~50%. Такая же степень включения наблюдается в непрореагировавшем субстрате.

Таким образом, реакция гидролиза лейцинамида, катализируемая лейцинаминопептидазой, протекает по общему основному механизму (схема 2). К сожалению, характер группы X в этом ферменте до сих пор неизвестен. Весьма вероятно, что X — это функционально активный остаток аминокислоты. Не исключено, однако, что ионизация воды происходит за счет ее включения в координационную сферу атома цинка.

Авторы благодарят д-ра Ю. Лаша за предоставление образца лейцинаминопептидазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lasch J., Kudernatsch W., Hanson H. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 53—57.
2. Antonov V. K., Ginodman L. M., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Gurova A. G., Rumsh L. D. (1978) *FEBS Lett.*, **88**, 87—90.
3. Antonov V. K. (1977) *Adv. Exptl Med. and Biol.*, **95**, 179—198.
4. Hanson H., Lasch J. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **348**, 1525—1539.

Поступило в редакцию
10.V.1979

CATALYTIC MECHANISM FOR LEUCINE AMINOPEPTIDASE

ANTONOV V. K., YAVASHEV L. P., VOLKOVA L. I.,
SADOVSKAYA V. L., GINODMAN L. M.

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

The incorporation of ^{18}O from heavy-oxygen water into the transpeptidation product (H-Leu-Leu-NH₂) of the leucine aminopeptidase catalyzed hydrolysis of H-Leu-NH₂ and into the substrate has been studied. The evidence was obtained that the enzymatic cleavage of the amide bond proceeds according to the mechanism of general base catalysis.