



УДК 577.156.02

СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СУБТИЛИЗИНА

II. *Н*-*цис*-ЦИННАМОИМИДАЗОЛ — $k_{\text{кат}}$ -ИНГИБИТОР СУБТИЛИЗИНА *

Кост О. А., Казанская Н. Ф., Руденская Г. Н.

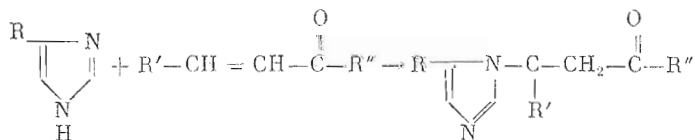
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет

цис-Циннамоимидазол инактивирует субтилизин с образованием модифицированного циннамоильным остатком фермента, не способного к реактивации путем деацилирования и к изомеризации двойной связи остатка коричной кислоты под действием УФ-света. Полученное инертное производное субтилизина было отделено от активного фермента методом аффинной хроматографии на бацитрацин-сефарозе. Аминокислотный анализ модифицированного белка показал, что содержание гистидина уменьшилось на один остаток.

Ранее была исследована реакция каталитического гидролиза субтилизином стереоизомеров циннамоимидазола с целью создания светочувствительной ферментативной системы. Был получен *цис*-циннамоилсубтилизин, который в определенных условиях (в 80% диоксане или при подщелачивании в присутствии нуклеофильных агентов) деацилируется с регенерацией каталитической активности фермента. Однако в отсутствие нуклеофильных агентов повышение pH среды вызывает быструю инактивацию *цис*-ацилфермента с образованием производного, инертного по отношению к щелочному гидролизу и к действию нуклеофильных агентов [1]. Было доказано, что циннамоильный остаток сохраняется в белковой глобуле, однако облучение препарата УФ-светом в течение 0,5—30 мин не вызывает спектральных изменений, характерных для *цис* — *транс*-изомеризации этиленовых производных. Этот факт указывает на протекание в *цис*-ацилферменте вторичной химической реакции, затрагивающей двойную связь остатка коричной кислоты и приводящей к необратимой инактивации субтилизина.

Подобные реакции, приводящие к инактивации ферментов при взаимодействии ацильного заместителя в активном центре с близлежащей аминокислотой, описаны в литературе [2, 3] и получили название $k_{\text{кат}}$ -ингибирования. Это означает, что ингибитор сначала выступает как субстрат, и только на какой-либо стадии его каталитического превращения можно наблюдать вторичную реакцию инактивации [3].

В нашем случае наиболее вероятным казалось взаимодействие одного из имидазолов в молекуле ацилсубтилизина с двойной связью остатка коричной кислоты. Известно, что *N*-алкилирование имидазолов соединениями с активированной двойной связью по схеме



* Предыдущая работа этой серии — см. [1].

может протекать достаточно легко даже при комнатной температуре в щелочной среде [4—6]. Стабильность получающихся продуктов в условиях кислотного гидролиза (6 н. HCl, 105° C) сильно зависит как от природы алкильного заместителя при атоме азота [7, 8], так и от наличия заместителей в имидазольном ядре молекулы [4, 9]. Характерным примером является исследованная Беше [2] инактивация α -химотрипсина 3,4-дигидро-3,4-дибром-6-бромметилкумаринном, сопровождающаяся потерей одного остатка гистидина в аминокислотном составе. Вместе с тем модельная реакция незамещенного имидазола с инактиватором приводила к образованию N-алкилимидазола, стабильного в условиях кислотного гидролиза.

Предварительные эксперименты с недостаточно очищенными образцами субтилизина показали некоторое снижение содержания гистидина в модифицированном ферменте по результатам аминокислотного анализа. Однако присутствие балластных белков и высокое содержание *транс*-ацилфермента (до 60%) в исследуемой смеси не позволяли получать надежные результаты. Поскольку можно было рассчитывать на исчезновение только одного остатка гистидина из четырех в индивидуальном модифицированном ферменте, необходимо было выделить полностью активный субтилизин и получить из него полностью инактивированное производное.

Очистку исходного субтилизина, шт. 72, провели методом аффинной хроматографии на бацитрацин-сефарозе, успешно применявшейся ранее для очистки субтилизинов других штаммов [10, 11]. После двукратной хроматографии был получен субтилизин с практически 100% содержанием активных молекул, что показано титрованием аналогично работе [12].

Препарат неактивируемого *цис*-диннамоилсубтилизина готовили из активного фермента облучением реакционной смеси последнего с *транс*-диннамоилимидазолом или путем облучения *транс*-ацилфермента с последующим отделением от активного субтилизина на колонке с бацитрацин-сефарозой (см. «Эксперимент. часть»). Полноту разделения контролировали подведением баланса ферментативной активности и поглощения выделенных фракций.

Аминокислотный анализ субтилизина, содержащего 100% активных молекул, и модифицированного фермента показал их идентичность по всем аминокислотным остаткам, за исключением содержания гистидина. В активном ферменте оно составило 3,8 ост./моль, считая, что молекула белка включает два остатка аргинина [13], а в модифицированном — 3 ост./моль. Таким образом, результат анализа подтвердил предположение о взаимодействии остатка коричной кислоты по двойной связи с остатком гистидина в молекуле белка.

По данным рентгеноструктурного анализа субтилизина BPN', который также инактивируется *цис*-диннамоилимидазолом [1], расстояние между N^ε-атомом гистидина-64 и кислородным атомом серина-221 составляет около 3,5 Å [14], что соответствует расстоянию между β -углеродным атомом двойной связи и атомом кислорода оксигруппы в молекуле коричной кислоты [15]. Подобное соответствие межатомных расстояний делает наиболее вероятным алкилирование остатка имидазола именно гистидина-64, входящего в каталитический ансамбль активного центра, хотя нельзя полностью исключить реакцию и с гистидином-67, также находящимся на расстоянии не далее 10 Å от серина-221 [14]. К сожалению, отсутствуют данные по третичной структуре субтилизина, шт. 72, имеющего на два остатка гистидина меньше, чем субтилизин BPN' [13].

Наблюдаемую нами необратимую инактивацию только *цис*-диннамоилсубтилизина, но не *транс*-производного, видимо, следует объяснить не только большей константой дезацилирования последнего, вдвое превышающей константу инактивации *цис*-ацилфермента [1], но и меньшей реакционной способностью двойной связи, находящейся в *транс*-положении [16].

Имеющиеся данные показывают, что *цис*-циннамоилимидазол проявляет свою ингибирующую активность не в комплексе Михаэлиса, а после образования ацилфермента, поскольку ингибирование может быть достигнуто как путем прямого взаимодействия ингибитора с ферментом, так и фотоизомеризацией предварительно полученного *транс*-циннамоилсубтилизина [1].

Итак, характер взаимодействия субтилизина с *цис*-циннамоилимидазолом действительно дает основание отнести последний к типу k_{cat} -ингибиторов.

Экспериментальная часть

В работе был использован субтилизин (КФ 3.4.21.14) из *Bacillus subtilis*, шт. 72, предоставленный нам лабораторией Л. И. Орещенко (ВНИИбиотехника). Процентное содержание активных молекул фермента в исходном образце, определенное титрованием его навески *транс*-циннамоилимидазолом аналогично работе [12], составляло 52%.

N-транс-Циннамоилимидазол синтезировали в нашей лаборатории по методу [17] (т. пл. 133,5° С), этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (Ас-Тур-ОEt) — по методу [18].

В работе использовали бацитрацин (Serva, ФРГ), CNBr-активированную сефарозу (Pharmacia, Швеция). Бацитрацин-сефарозу для аффинной хроматографии получали по методу [10].

Определение эстеразной активности субтилизина по Ас-Тур-ОEt проводили на рН-стате (Radiometer, Дания) при рН 8,5 и 25° С.

Источником УФ-света служила ртутная лампа ДРШ-250 со светофильтром УФС-2 (диапазон 290—360 нм).

Гомогенный фермент получали очисткой на колонке с бацитрацин-сефарозой. Для этого 100 мг субтилизина (52% активных молекул) растворяли в 100 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, содержащего 0,05 М CaCl₂ (рН 8,5), раствор центрифугировали и наносили на колонку (0,9×5,2 см) с бацитрацин-сефарозой. Неактивный белок элюировали тем же буфером. Активный фермент элюировали 25% раствором изопропилового спирта в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,5), содержащем 1 М NaCl и 0,05 М CaCl₂. Однократная очистка приводила с выходом 87—92% к получению препарата с содержанием активных молекул 80—85%. Его рехроматографией был получен полностью активный фермент с практически 100%-ным выходом. Фермент освобождали от избытка NaCl и органического растворителя диализом против 0,05 М трис-НСl-буфера, содержащего 0,05 М CaCl₂ (рН 8,5).

цис-Циннамоилсубтилизин получали двумя способами.

А. Фермент (100% активных молекул) обрабатывали избытком *транс*-циннамоилимидазола в 0,05 М трис-НСl-буфере, содержащем 0,05 М CaCl₂, 6% CH₃CN (рН 8,5) при одновременном облучении УФ-светом в течение 20 мин в соответствии с работой [1]. Содержание активного фермента в реакционной смеси уменьшалось при этом на 30%. Затем освобождались от избытка циннамоилимидазола диализом против 0,05 М трис-НСl-буфера 0,05 М CaCl₂ (рН 8,5). В этих условиях *транс*-циннамоилсубтилизин быстро дезацилируется с регенерацией активного фермента, а *цис*-циннамоилсубтилизин образует неактивируемое производное [1].

Б. Раствор субтилизина (100% активных молекул) диализовали против 0,1 М ацетатного буфера, содержащего 0,05 М CaCl₂ (рН 4,4), при этом следили за сохранением активности фермента. Отдиализованный раствор обрабатывали избытком *транс*-циннамоилимидазола и выделяли *транс*-ацилфермент, как описано ранее [1]. Последующее облучение ацилфермента УФ-светом в течение 20 мин приводило к образованию его *цис*-изомера (40% по результатам определения активности с Ас-Тур-ОEt). Раствор вновь диализовали против 0,05 М трис-НСl-буфера, содержащего 0,05 М CaCl₂ (рН 8,5).

Отделение неактивируемого производного *цис*-циннамоилсубтилизина от активного фермента проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с бацитрацин-сефарозой по той же методике, что и в случае очистки субтилизина от балластных белков. Модифицированный фермент элюировали 0,05 М трис-НСl-буфером с 0,05 М CaCl₂ (рН 8,5). Использование в эксперименте субтилизина высокой степени очистки позволяло получить модифицированный фермент практически без примесей балластных белков. Действительно, количество белка, элюируемое при этих условиях, соответствовало ожидаемому и составляло 30 и 40% соответственно для разных методик получения *цис*-циннамоилсубтилизина.

Для проведения аминокислотного анализа препараты субтилизина предварительно диализовали против 0,005 М трис-НСl-буфера, содержащего 0,005 М CaCl₂ (рН 8,5), лиофильно высушивали и затем гидролизовали 6 н. НСl при 105° С в течение 24 ч в вакуумированных ампулах. Гидролизаты исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе КЛА-3 (Hitachi, Япония), за что авторы приносят благодарность отделу хроматографии Межфакультетской лаборатории биоорганической химии. Молекулярные отношения аминокислот вычисляли, считая, что молекула белка содержит два остатка аргинина [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кост О. А., Казацкая Н. Ф. (1979) Биорган. химия, 5, 1102-1111.
2. Bechet J.-J., Duraix A., Yon J. (1973) Eur. J. Biochem., 35, 527-539.
3. Rando R. R. (1977) in: Methods Enzymol. (Akobey V. B., Vilchek M., eds), vol. 46, pp. 28-41, Acad. Press, N. Y.
4. Эфрос Л. С., Порай-Копин Б. А. (1953) Ж. общ. химии, 23, 697-705.
5. Yamada F., Fujimoto J. (1974) Bull. Chem. Soc. Japan, 44, 557-558.
6. Yamada F., Kitano O., Schindo S., Ueda H. (1976) Bull. Chem. Soc. Japan, 49, 2833-2836.
7. Пожарский А. Ф., Симонов А. М., Звездина Э. А., Чуб Н. К. (1967) Химия гетероцикл. соед., 889-893.
8. Пожарский А. Ф., Симонов А. М., Звездина Э. А., Анисимова В. А. (1969) Химия гетероцикл. соед., 869-873.
9. Rahman M. F., Neelakantan P., Thyagarajan G. (1975) Ind. J. Chem., 13, 531-532.
10. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Яноис В. В., Остославская В. И., Гончар М. В., Котлова Е. К., Стронгин А. Я. (1978) Биорган. химия, 4, 1256-1262.
11. Руденская Г. Н., Лысогорская Е. Н., Абрамов З. Т., Остославская В. И., Коллова Е. К., Степанов В. М. (1979) Тез. докл. III Всес. конф. по методам получения и анализа биохимических реактивов, Олайне.
12. Bender M. L., Begue-Canton M. L., Blakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Ginter C. R., Kezdy F. J., Killheffer J. V., Jr., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. K. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 5890-5913.
13. Акпаров В. Х., Белякова Л. П., Баратова Л. А., Степанов В. М. (1979) Биохимия, 44, 886-891.
14. Wright C. S., Alden R. A., Kraut J. (1969) Nature, 221, 235-242.
15. Hofmann H.-J., Vetter R., Epperlein J. (1973) J. Signal AMI, 3, 211-220.
16. Jones J. B., Young J. M. (1970) Can. J. Chem., 48, 1566-1573.
17. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930-2935.
18. Vigneaed V., Weyer E. (1932) J. Biol. Chem., 98, 295-308.

Поступила в редакцию
13.II.1980

LIGHT-SENSITIVE DERIVATIVES OF SUBTILISIN. II. *N*-*cis*-CINNAMOYLIMIDAZOLE — *k*_{cat}-INHIBITOR OF SUBTILISIN

KOST O. A., KAZANSKAYA N. P., RUDENSKAYA G. N.

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

Subtilisin was inactivated by *cis*-cinnamoylimidazole to form a modified enzyme which could not be reactivated by deacylation and failed to isomerize on light exposure. The inert enzyme thus obtained and active subtilisin were separated on a column with bacitracin-Sepharose. A histidine content of the modified enzyme decreased from four to three residues as follows from the amino acid analysis.