



УДК 577.156

НЕКОТОРЫЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА КАТЕПТИЧЕСКОЙ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А **Дикчюте Р. А., Орехович В. Н.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Определен аминокислотный состав и изучены некоторые свойства катептической карбоксипептидазы А, выделенной из печени кур. Результаты, показывающие наличие в молекуле фермента 2—4 свободных SH-групп, а также данные, полученные при изучении действия некоторых ингибиторов и активаторов на активность катептической карбоксипептидазы А, свидетельствуют о том, что этот фермент относится к числу тиоловых протеаз. При электрофорезе в полиакриламидном геле очищенный препарат катептической карбоксипептидазы А, обработанный ДСН, движется одной полосой, соответствующей белку с M 62 700. Сопоставление этих данных с молекулярным весом вативного препарата фермента, определенным при помощи гель-фильтрации, позволяет предположить, что при обработке ДСН катептическая карбоксипептидаза А распадется на две субъединицы с одинаковым молекулярным весом. Коэффициент седиментации фермента равен 6,78 S.

В настоящее время описано несколько лизосомальных карбоксипептидаз, активных в кислой среде: пролинкарбоксипептидаза-ангиотензиназа [1], тирозинкарбоксипептидаза [2], трипептидкарбоксипептидаза [3], катепсин А и катептические карбоксипептидазы А, В и С [4]. Из всех этих ферментов только пролинкарбоксипептидаза из коркового слоя почек [1], катепсин А из селезенки [5] и печени [6] получены в высокоочищенном состоянии. В большинстве же работ для исследования тканевых карбоксипептидаз были использованы препараты, содержащие примеси, и поэтому многие свойства указанных ферментов до сих пор недостаточно четко изучены. В настоящей работе приводятся данные, полученные при изучении ряда свойств катептической карбоксипептидазы А.

Для исследований использовали препарат фермента, который выделяли из печени кур и очищали по разработанной нами ранее методике [7]. Фермент при электрофорезе в 7%-ном полиакриламидном геле (рН 8,9) движется одной полосой (рис. 1) и седиментирует в ультрацентрифуге одним симметричным пиком (рис. 2), что свидетельствовало о гомогенности полученного препарата. По данным седиментационных диаграмм был рассчитан коэффициент седиментации катептической карбоксипептидазы А (6,78 S) при концентрации фермента 7 мг/мл в 0,9% NaCl.

* Принятые сокращения: ДСН — додецилсульфат натрия, ПХМБ — *n*-хлор-меркурибензоат, ДТНБ — 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.



Рис. 1. Электрофорез катептической карбоксипептидазы А в 7%-ном полиакриламидном геле (трис-глициновый буфер, рН 8,9; количество белка — 50 мкг, сила тока на трубку — 5 мА)

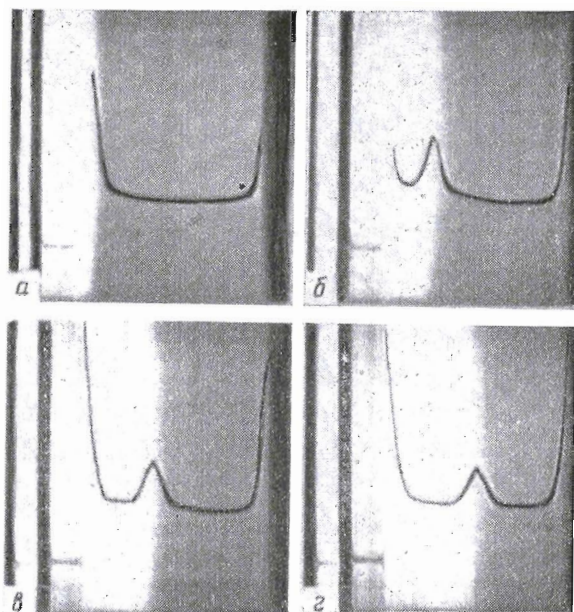


Рис. 2. Седиментационные диаграммы катептической карбоксипептидазы А. Ультрацентрифуга — модель «Spinco» (США), скорость вращения ротора — 56 100 об/мин, 20°, концентрация фермента — 7 мг/мл в 0,9% NaCl: а — через 6, б — 30, в — 45 и г — через 60 мин после достижения полной скорости

При определении аминокислотного состава катептической карбоксипептидазы А было показано, что фермент содержит большое количество дикарбоновых аминокислот (табл. 1). В кислотных гидролизатах фермента не были обнаружены метионин и цистеин. Возможно, при гидролизе эти аминокислоты полностью разрушаются, так как перед проведением аминокислотного анализа белок не был окислен надравьиной кислотой.

Как видно из табл. 1, катепсин А также содержит большое количество дикарбоновых аминокислот и по соотношению кислых и основных аминокислот, равном примерно 2, сходен с катептической карбоксипептидазой А.

Количество свободных SH-групп в молекуле фермента определяли двумя методами. Методом Элмана [11] обнаружили 2—3, а при титровании фермента ПХМБ (метод Бойера [8]) 3—4 свободные SH-группы (рис. 3). Некоторое различие в количестве свободных SH-групп, определенных разными методами, зависит, по-видимому, только от чувствительности методов, так как в обоих случаях был использован гомогенный препарат фермента с одинаковой активностью.

Мы установили ранее, что алкилирующие соединения (йодацетамид, монохлоруксусная кислота), ртуть-органические соединения и ионы тяжелых металлов тормозят активность катептической карбоксипептидазы А, а β-меркаптоэтанол и цистеин активируют фермент [7].

В табл. 2 представлены данные о действии ионов галоидов на активность катептической карбоксипептидазы А, а также действие β-меркаптоэтанолом и цистеина на фермент, предварительно обработанный мергиолатом. Было показано, что F⁻ и I⁻ в 50 и 170 мМ концентрациях в значительной степени инактивируют фермент. В присутствии Cl⁻ и Br⁻ (50 и 170 мМ) активность фермента практически не изменялась, но в присутствии NaCl катептическая карбоксипептидаза А была более стабильна. Известно, что

Таблица 1

Аминокислотный состав катептической карбоксипептидазы А катепсина А

Число аминокислотных остатков катептической карбоксипептидазы А и катепсина А рассчитано, исходя соответственно из *M* 110 000 и 35 000

Аминокислотные остатки	Число аминокислотных остатков		Аминокислотные остатки	Число аминокислотных остатков	
	катептическая карбоксипептидаза А	катепсин А [5]		катептическая карбоксипептидаза А	катепсин А [5]
Lys	40,7	17	Ala	52,8	21
His	20,2	5,5	Cys **	3,9	—
Arg	40,5	7	Val	47,3	25
Cys	—	9,5	Met	—	—
Asp	151,2	26	He	27,7	9,5
Thr	38,4	24,5	Leu	47,3	29
Ser *	58,1	27,5	Tyr ***	46,5	9,5
Glu	69,3	29	Phe	33,5	8,5
Pro	41,8	22,5	Trp ***	22,2	12,7
Gly	54,9	22			

* Значения экстраполированы к нулевому времени гидролиза.

** Определение по методу Бойера [8] в модификации Левина и соавт. [9].

*** Определение спектральным методом Эдельхоха [10].

Таблица 2

Действие ингибиторов и активаторов на активность катептической карбоксипептидазы А

Реагенты	Концентрация, мМ	Активность	
		микомоль тирозина/мг/ч	%
NaF	50	1,51	23,4
	170	1,51	23,4
KI	50	1,22	18,8
	170	5,52	84,9
NaBr	50	6,58	101,2
	170	6,26	96,3
NaCl	50	6,82	105,0
	170	6,66	102,5
Контроль	—	6,5	100
Мертиолат	0,2	0	0
	0,02	2,54	49,4
Мертиолат + β-меркаптоэтанол	0,2+0,2	3,46	67,4
	0,02+0,02	6,07	117,9
Мертиолат + цистеин	0,2+0,2	3,31	64,3
	0,2+0,02	3,77	73,3
Контроль	—	5,15	100

галоиды активируют катепсины В [12] и С [13], которые являются тиоловыми протеиназами. Известно также, что активность тиоловых протеиназ, инактивированных ртуть-органическими соединениями, может быть восстановлена при обработке активаторами SH-групп. По нашим данным (табл. 2), β-меркаптоэтанол и, в меньшей степени, цистеин способны восстанавливать активность катептической карбоксипептидазы А, обработанной ингибитором фермента — мертиолатом. Таким образом, эти результаты, а также данные, показывающие наличие свободных SH-групп в молекуле фермента, свидетельствуют о том, что катептическая карбоксипептидаза А из печени кур является тиоловой протеиназой. Этот вывод соответствует ранее полученным результатам [14, 15]. Так, было показано, что активность ка-

тептической карбоксипептидазы А увеличивается в присутствии активаторов SH-групп [14, 15]. Было также установлено, что активность фермента из лизосом печени крыс тормозится ПХМБ [15], а на активность фермента из селезенки тормозящее действие оказывал йодацетамид [14]. Действие других соединений, специфически реагирующих с сульфгидрильными группами, не было изучено. Кроме того, в указанных работах, поскольку были использованы грубоочищенные препараты катептической карбоксипептидазы, не было определено число SH-групп и не исследованы физико-химические свойства ферментов.

По нашим данным, катептическая карбоксипептидаза А, обработанная ДСН, движется одной полосой при электрофорезе в 5,6%-ном полиакриламидном геле и имеет M 62 700 (рис. 4). Сравнимая величины M (105 000—107 000), определенные нами методом гель-фильтрации нативного препарата фермента [7], с данными,

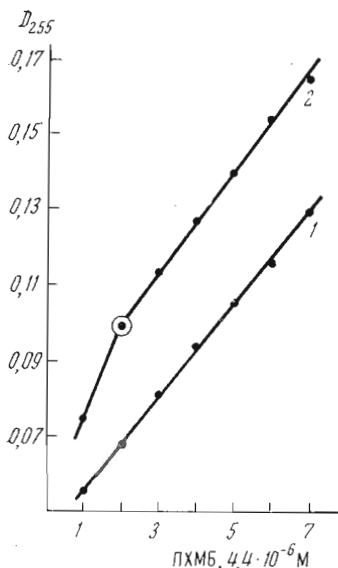


Рис. 3. Определение сульфгидрильных групп при титровании фермента ПХМБ: 1 — калибровочная кривая, 2 — образование меркаптидов в реакции фермента с ПХМБ

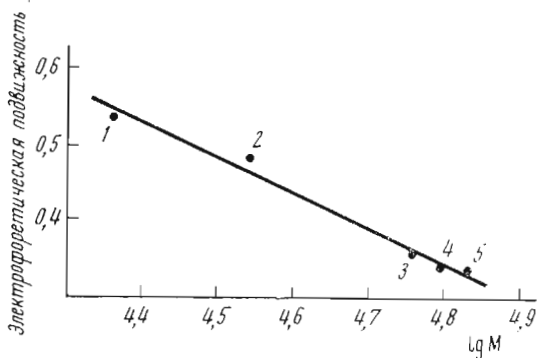


Рис. 4. Определение молекулярного веса обработанной детергентом катептической карбоксипептидазы А методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН: 1 — трипсин, 2 — ленин, 3 — каталаза, 4 — катептическая карбоксипептидаза А, 5 — сывороточный альбумин

полученными при электрофорезе (рис. 4), можно предполагать, что катептическая карбоксипептидаза А при обработке ДСН распадается на две субъединицы с одинаковым молекулярным весом.

Экспериментальная часть

Количество белка определяли методом Лоури [16] и по поглощению при 280 нм. В качестве стандарта использовали сывороточный альбумин быка. Электрофорез препаратов фермента проводили по методу Дэвиса [17] в 7%-ном полиакриламидном геле при pH 8,9. Гомогенность катептической карбоксипептидазы А оценивали методом ультрацентрифугирования. Аминокислотный состав фермента определяли, используя автоматический аминокислотный анализатор KLA-3B («Hitachi», Япония). Фермент в количестве 1 мг гидролизovali в запаяных ампулах в 6 н. HCl 24,48 и 96 при 110°.

Свободные сульфгидрильные группы фермента определяли методами Элмана [11] и Бойера [8] в модификации Левина и соавт. [9]. При определении SH-групп по методу Элмана к 400—600 мкг фермента в контрольной и опытной пробе добавляли по 0,3 мл 1 M трис-HCl буфера (pH 8,0) и до-

водили объем пробы водой до 2 мл. Затем в опытную пробу добавляли 0,013 мл реактива Элмана (3,96 мг ДТНБ в 1 мл 0,025 *M* фосфатного буфера, pH 7,0). Прирост экстинкции в реакционной смеси определяли при 412 нм против контрольной пробы в течение 15—20 мин через каждые 2—3 мин. Окраска развивалась в результате образования окрашенного аниона *n*-нитрофенола при реакции тиола с ДТНБ. Расчет количества свободных сульфгидрильных групп на молекулу белка проводили, исходя из величины коэффициента молярной экстинкции аниона, равной 13 600.

При определении сульфгидрильных групп методом Бойера [8] 2 мг ПХМБ растворяли в 0,3 мл 1,5% NaOH и к раствору добавляли 10 мл 0,1 *M* фосфатного буфера (pH 7,0). После центрифугирования исходный раствор разбавляли в 20 раз и измеряли поглощение при 232 нм. Молярный коэффициент экстинкции ПХМБ равен $1,69 \cdot 10^4$. К 830—1100 мкг фермента в объеме 1,3—1 мл добавляли 1,7—2 мл 0,1 *M* фосфатного буфера (pH 7,0). Затем опытную пробу титровали исходным ПХМБ (7 раз по 0,03 мл); после каждого добавления измеряли поглощение при 255 нм против контрольной пробы, не содержащей ПХМБ. В результате образования меркаптидов наблюдали резкий излом кривой титрования. Калибровочный график строили при добавлении тех же количеств ПХМБ к пробам, не содержащим фермента. Вместо белкового раствора добавляли соответствующий объем фосфатного буфера.

При изучении влияния на активность катептической карбоксипептидазы А ионов галоидов, мертиолата, β-меркаптоэтанола и цистеина проводили предынкубацию фермента (17—32 мкг) с соответствующим реагентом (концентрация — см. табл. 2) при комнатной температуре в течение 15—20 мин в 0,1 *M* ацетатном буфере (pH 4,0). Объем пробы — 0,9 мл. Затем в смесь добавляли дипептид Z-Glu-Tyr в $2,3 \cdot 10^{-4}$ *M* концентрации на пробу и инкубацию продолжали 1 ч при 37°. Количество тирозина, освобожденного в процессе ферментативного гидролиза дипептида, определяли нингидриновым методом [18]; удельную активность катептической карбоксипептидазы А выражали в микромолях тирозина, освобожденного за 1 ч, и рассчитывали на 1 мг белка.

Молекулярный вес фермента определяли в присутствии ДСН в 5,6%-ном полиакриламидном геле [19]. Исследуемый фермент и стандартные белки (трипсин, пепсин, каталазу и сывороточный альбумин) в количестве 40—60 мкг выдерживали при 55° в течение 1 ч в смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl буфера, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ дитиотреитола и 1% ДСН. Подвижность белка (Π) рассчитывали по уравнению:

$$\Pi = \frac{D_1 \cdot D_2}{l_1 \cdot l_2},$$

где D_1 и D_2 — соответственно путь, пройденный белком и краской (см); l_1 и l_2 — соответственно длина геля после обесцвечивания и до окраски (см).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kakimoto T., Oshima G., Yeh H. S. J., Erdös E. G. (1973) *Biochim. et biophys. acta* 302, 178—182.
2. Dunn N. W., McQuillan M. T. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 235, 149—158.
3. Buddecke E., Reich G., Stein U. (1966) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 347, 192—206.
4. Taylor S. L., Tappel A. L. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 341, 99—111.
5. Логунов А. И., Орехович В. Н. (1972) *Биохимия*, 37, 855—861.
6. Taylor S. L., Tappel A. L. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 341, 112—119.
7. Дикчюте Р. А. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 239—247.
8. Boyer P. D. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 4331—4337.
9. Левин Е. Д., Егоров Ц. А., Степанов В. М. (1965) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 5, 825—829.
10. Edelhoch H. (1967) *Biochemistry* 6, 1948—1954.
11. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 82, 70—77.

12. De Lumen B. O., Tappel A. L. (1973) *Biochim. and biophys. acta*, **293**, 217—225.
13. McDonald J. K., Reilly T. J., Zeitman B. B., Ellis S. (1966) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **24**, 771—775.
14. Greenbaum L. M., Sherman R. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1082—1085.
15. Mellors A. (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **144**, 281—285.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
17. Davis B. J. (1964) *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
18. Ryle A. P., Porter R. R. (1959) *Biochem. J.*, **73**, 75—86.
19. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. K. H. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2606—2617.

Поступила в редакцию
30.XII.1974

SOME ENZYMIC AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CATHEPTIC CARBOXYPEPTIDASE A

DIKTCHUTE R. A., OREKHOVICH V. N.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The amino acid composition of catheptic carboxypeptidase A from chicken liver has been determined. It was shown that the enzyme contains 2-4 free SH groups and belongs to the thiol proteases family. A study was made of the effects produced by a number of inhibitors and activators on the activity of catheptic carboxypeptidase A. On electrophoresis in polyacrylamide gel, the SDS-treated enzyme gave one distinct band corresponding to a protein with a molecular weight of 62 700. Comparison of these data with a molecular weight of the native enzyme, as determined by gel filtration, indicates that on treatment of catheptic carboxypeptidase A with SDS, the enzyme dissociates into 2 subunits of equal molecular weight. The sedimentation coefficient of the enzyme was found to be 6.78 S.