



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

СТАДИЙНОСТЬ КАТАЛИЗИРУЕМОГО ПЕПСИНОМ ГИДРОЛИЗА ПЕПТИДОВ

Тиходеева А. Г., Ружи Л. Д., Антонов В. Б.

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

Образование при катализируемом пепсином гидролизе пептидов так называемого amino-фермента [1] происходит, по мнению Сильвера и соавт. [2], лишь в случае необычных для этой эндонептидазы субстратов типа Ас-А-В-ОН, где А и В — остатки ароматических аминокислот. Этот вывод был сделан [2] на основании невозможности обнаружить катализируемую пепсином транспептидацию по типу amino-переноса в случае субстратов, имеющих защищенную карбоксильную группу — Ас-Phe-Phe-OEt и Ас-Phe-Tyr-NH₂.

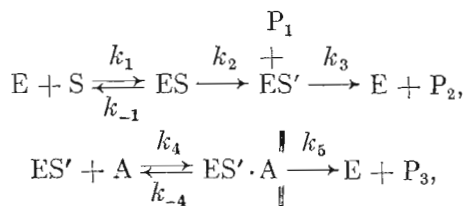
Используя хорошо растворимый в воде субстрат — γ -морфолинопропиламид N-ацетил-L-фенилаланил-L-фенилаланина (I, Ас-Phe-Phe-APM) [3] и разработанный нами [4] метод регистрации начальных скоростей транспептидации, мы показали, что защищенные по карбоксильной группе дипептиды являются эффективными донорами транспептидации. Таким образом, постулированный ранее [1] трехстадийный механизм катализируемого пепсином гидролиза является общим для субстратов со свободной и с защищенной карбоксильной группой.

Реакцию транспептидации проводили при pH 4,61 (0,1M ацетатный буфер, 37°) в системе, содержащей пепсин (8,77 · 10⁻⁵ M), субстрат (I) и N-бензилоксикарбонил-n-нитро-L-фенилаланин в качестве акцептора. Начальную скорость образования продукта транспептидации — γ -морфолинопропиламина N-бензилоксикарбонил-n-нитро-L-фенилаланил-L-фенилаланина измеряли по изменению оптической плотности при 320 нм ($\Delta\epsilon = 1000$) на спектрофотометре Cary-15 (США). Экспериментальная кинетическая кривая приведена на рисунке.

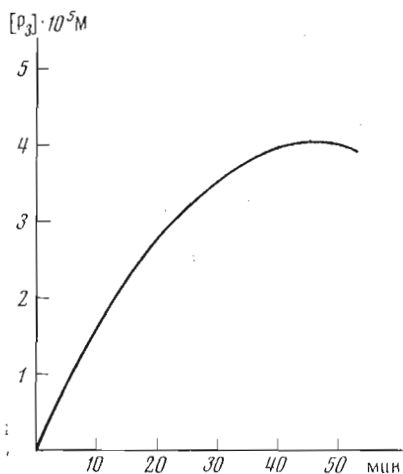
Константы гидролиза и транспептидации

Субстрат	[S], mM	[A], mM	$k_{кат}$, мин ⁻¹	K_m , mM	$k_s \cdot 10^2$, мин ⁻¹	$K_{T(эфф)}$, mM
Ас-Phe-Phe-APM	1—5 7,9	0 0,4—2,0	6,25	2,5	4,95	1,78
Ас-Phe-Tyr-OH	3—20 8,4	0 0,25—1,0	1,62	43,9	3,10	0,156

Обработку результатов эксперимента проводили по предложенной нами ранее [4] схеме:



где E — фермент, S — субстрат, A — акцептор, ES' — аминфермент, P₁ и P₂ — соответственно N- и C-концевой продукты гидролиза субстрата и P₃ — продукт транспептидации.



Кинетическая кривая образования продукта транспептидации Ac-Phe-Phe-APM [S] = 7,9 · 10⁻³; [A] = 1 · 10⁻³; [E] = 1 · 10⁻⁴ M

дипептида (II). Однако величина K_{т(эфф)} для амида (I) более чем в 10 раз выше соответствующей величины для субстрата (II).

Так как в величину K_{т(эфф)} входят значения констант скорости образования и распада аминфермента (k₂ и k₃), весьма вероятно, что уменьшение скорости транспептидации в случае защищенного субстрата (I) обусловлено, в основном, увеличением скорости распада амин фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fruton J. S. (1970) *Advances Enzymol.*, 33, 401—443.
2. Silver M. S., Stoddard M. (1972) *Biochemistry*, 11, 191—200.
3. Тиходеева А. Г., Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1974) Докл. АН СССР, 214, 355—357.
4. Antonov V. K., Rumsh L. D., Tikhodeeva A. G. (1974) *FEBS Lett.*, 46, 29—33.

Поступила в редакцию
30.I.1975