



УДК 577.152.341 * 1.01:577.112.083

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТВОРИМОЙ
И МЕМБРАННОЙ АМИНОПЕПТИДАЗ МОЗГАI. ВЫДЕЛЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА,
КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

*Колесанова Е. Ф. *, Ротанова Т. В., Америк А. Ю.,
Гинодман Л. М., Антонов В. К.*

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

**Институт физиологически активных веществ Академии наук СССР,
Черноголовка Московской обл.*

Разработаны методики выделения высокоочищенных препаратов растворимой и мембранной аминокептидаз из мозга быка. В качестве одной из стадий очистки использована хроматография на аминокексил-сефарозе, которая рассматривается как вариант биоспецифической хроматографии. Найдево, что молекулярные массы ферментов одинаковы и составляют 100 000–107 000. У обеих аминокептидаз не обнаружено субъединичной структуры. Изоэлектрические точки ферментов одинаковы (pI 4,6). При исследовании каталитической активности установлено, что оба фермента блокируются хелатообразующим агентом *о*-фенантролином и модификатором SH-групп *п*-оксимеркурбензоатом, каталитические параметры гидролиза специфического субстрата, *п*-нитроанилида *L*-лейцина, одинаковы. По исследованным физико-химическим параметрам и энзиматическим свойствам различий между растворимой и мембранной аминокептидазами не обнаружено.

В сложном комплексе процессов, происходящих при функционировании нервной системы, существенная роль принадлежит нейропептидам и пептидгидролазам, ответственным за их образование и деградацию. Согласно современным представлениям, нейропептиды влияют на процесс передачи нервного импульса, т. е. функционируют как нейромодуляторы, а в некоторых случаях выступают и как нейромедиаторы. Систему нейропептид — деградирующая его пептидгидролаза можно сопоставить с такими системами, как катехоламины — моноаминоксидаза, ацетилхолин — ацетилхолинэстераза. В связи с этим понятен интерес к пептидгидролазам мозга, поскольку в ходе исследований этих ферментов могут быть найдены пути регуляции их активности, а следовательно, и уровни атакуемых ими нейропептидов.

У многих нейропептидов *N*-концевая аминокислота имеет свободную α -аминогруппу. Естественно, что такие пептиды (в частности, энкефалины) являются потенциальными субстратами аминокептидаз. Более того, как следует из ряда работ, в том числе и работ нашей лаборатории [1–4], в деградации некоторых нейропептидов эти ферменты играют доминирующую роль. В ткани мозга обнаружено два вида аминокептидаз: растворимая и мембраносвязанная. К началу нашей работы были выделены и охарактеризованы препараты растворимой аминокептидазы из мозга ряда млекопитающих: крысы [5, 6], мыши [7], быка [8, 9], свиньи [10], обезьяны [11], а также человека [12]. Препараты мембранной аминокептидазы в очищенном виде не были получены.

Общая задача наших исследований состояла в сравнении свойств растворимой и мембранной аминокептидаз из одного источника (мозга быка) и изучении возможных путей регуляции их активности.

Принятое сокращение: EGTA — этиленгликольбис(оксиэтиленнитрило)тетрауксусная кислота.

Выделение растворимой аминопептидазы из мозга быка *

Стадия	Белок, мг	Общая актив- ность, мкмоль/мин	Удельная ак- тивность, мкмоль/мин· мг	Выход, %	Степень очистки
Экстракция ткани мозга	2750	178	0,0646	100	1
Обработка стрептомицин- сульфатом	2370	209	0,088	117	1,36
Фракционирование сульфатом аммония (40–70% насыщ.)	1040	122	0,117	68	1,80
DEAE-сефароза CL-6B	105	96,3	0,92	54	14,3
Аминогексил-сефароза 4B	16	97,6	6,1	55	94,3
Гидроксипатит	4,5	58,1	13,1	32	203
Аминогексил-сефароза 4B	1,6	29	18,1	16	280

* 300 г коры мозга.

Таблица 2

Выделение мембранной аминопептидазы из мозга быка *

Стадия	Белок, мг	Общая актив- ность, мкмоль/мин	Удельная ак- тивность, мкмоль/мин· мг	Выход, %	Степень очистки
Мембранная фракция гомо- гената мозга	1 520	7,12	0,0047	100	1
Солюбилизация (1% три- тон X-100)	560	2,20	0,0039	31	—
DEAE-сефароза CL-6B	13,1	7,43	0,567	104	121
Гидроксипатит	1,16	7,31	6,28	102	1335
Аминогексил-сефароза 4B	0,30	4,47	14,9	63	3170

* 150 г коры мозга.

В данном сообщении приводятся сведения о выделении высокоочищенных препаратов растворимой и мембранной аминопептидаз (КФ 3.4.11) и результаты сравнительного исследования их физико-химических и некоторых каталитических свойств.

Методика выделения растворимой аминопептидазы включала следующие стадии: экстракцию гомогената ткани коры мозга буферным раствором, обработку экстракта стрептомицин-сульфатом, фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на DEAE-сефарозе, аминогексил-сефарозе и гидроксипатите и повторную хроматографию на аминогексил-сефарозе. Активность фермента на стадиях выделения определяли по скорости гидролиза *n*-нитроанилида *L*-лейцина. Результаты выделения представлены в табл. 1, из которой видно, что хроматография на аминогексил-сефарозе является весьма эффективной стадией очистки. Эту стадию мы ввели, рассматривая ее как вариант биоспецифической хроматографии (аминогексильная группа носителя выступает в качестве специфического лиганда для активного центра аминопептидазы). В предложенной методике отсутствует часто применяемая при выделении аминопептидаз стадия гель-фильтрации, поскольку необходимое перед этой стадией концентрирование раствора фермента ультрафильтрацией приводит, по нашим наблюдениям, к существенной потере активности.

Очищенный препарат имел удельную активность по гидролизу *n*-нитроанилида *L*-лейцина 18,1 мкмоль/мин·мг белка, выход по активности — 16%, степень очистки (по отношению к экстракту ткани мозга) — 280. По данным электрофореза в полиакриламидном геле, выделенный препарат практически не содержал примесей.

Методика выделения мембранной аминопептидазы включала следующие стадии: получение мембранной фракции ткани коры головного мозга,

солюбилизацию тритоном X-100, хроматографию на DEAE-сефарозе, гидроксипатите и аминогексил-сефарозе. Как и в случае выделения растворимой аминопептидазы, активность фермента определяли по скорости гидролиза *n*-нитроанилида *L*-лейцина. Результаты выделения представлены в табл. 2. Суммарная активность препарата существенно снижается на стадии солюбилизации (что можно объяснить ингибирующим действием тритона X-100), а затем после удаления детергента она вновь возвращается к исходному уровню.

Очищенный препарат имел удельную активность по гидролизу *n*-нитроанилида *L*-лейцина 14,9 мкмоль/мин·мг белка, выход по активности — 63%, степень очистки (по отношению к мембранной фракции гомогената ткани мозга) — 3170. По данным электрофореза в полиакриламидном геле, полученный препарат был практически гомогенным.

При сопоставлении данных табл. 1 и 2 видно, что общая схема очистки растворимой и мембранной аминопептидаз, начиная со стадии хроматографии, была практически одинаковой. Важно отметить, что оба фермента элюировались с DEAE-сефарозы при одинаковых концентрациях хлористого натрия; такая же картина наблюдалась при элюировании ферментов с аминогексил-сефарозы (см. «Экспериментальную часть»). Это позволяло предположить, что заряды молекул аминопептидаз весьма близки. Действительно, методом изоэлектрического фокусирования установлено, что оба фермента имеют одинаковые изоэлектрические точки при pH 4,6; в литературе данных об изоточках аминопептидаз мозга не приведено.

Следует отметить также, что очищенные препараты ферментов обладают примерно одинаковой удельной активностью.

Молекулярные массы выделенных ферментов определяли двумя методами: гель-фильтрацией на сефадексе G-200 и электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола. Установлено, что молекулярные массы ферментов одинаковы и равны 100 000—107 000 (табл. 3). У обоих ферментов отсутствует субъединичная структура; об этом свидетельствует совпадение величин молекулярных масс, определенных в денатурирующих (гель-электрофорез) и неденатурирующих (гель-фильтрация) условиях.

Таким образом, по физико-химическим характеристикам растворимая и мембранная аминопептидазы из мозга быка оказались весьма сходными.

Полученные результаты позволяют ориентировочно оценить содержание обоих ферментов в ткани мозга. Расчет показывает, что содержание растворимой аминопептидазы составляет ~30 мг/кг мозга, а мембранной — ~3 мг/кг мозга. Учитывая величины молекулярных масс ферментов, находим, что «концентрация» растворимой аминопептидазы в ткани мозга составляет $\sim 3 \cdot 10^{-7}$ М, а мембранной — $\sim 3 \cdot 10^{-8}$ М.

Интересно сопоставить полученные нами характеристики ферментов с соответствующими данными для аминопептидаз мозга, известными из литературы, в том числе для двух мембранных аминопептидаз, сведения о которых были опубликованы уже в процессе наших исследований (табл. 3).

Обращаясь сначала к данным по растворимой аминопептидазе, можно отметить, что из всех исследованных источников были получены препараты с молекулярной массой 100 000. Вместе с тем для ферментов из мозга человека и быка приводятся и другие значения. За исключением одной работы, во всех исследованиях делается вывод об отсутствии субъединичной структуры. Упомянутое исключение касается аминопептидазы из мозга крысы; данные для этого фермента неоднозначны (табл. 3).

Таким образом, с большой степенью вероятности можно полагать, что растворимая аминопептидаза из мозга исследованных млекопитающих является ферментом с молекулярной массой 100 000, не имеющим субъединичной структуры.

В отношении мембранной аминопептидазы возможности для сравнения весьма ограничены. Полученные нами данные хорошо согласуются

Сравнительные данные по характеристике аминопептидаз мозга

Источник	Растворимая аминопептидаза			Мембранная аминопептидаза		
	мол. масса, $M_r \cdot 10^{-3}$	число субъединиц	год, лит-ра	мол. масса, $M_r \cdot 10^{-3}$	число субъединиц	год, лит-ра
Крыса	100	2	1979, [5]	250	4	1983, [14]
	102-115	1	1981, [6]			
Мышь	100	1	1980, [7]			
Бык	70	1	1979, [8]			
	100	1	1981, [9]			
	100-107	1	Данная работа	105	1	Данная работа
Обезьяна	92	1	1977, [11]	100	1	1983, [15]
Человек	61,5	1	1980, [12]			
	100	*	1983, [13]			

* Результаты не приведены.

Таблица 4

Кинетические параметры гидролиза *n*-нитроанилида и β -нафтиламида *L*-лейцина аминопептидазами ткани мозга

Субстрат	Растворимая аминопептидаза				Мембранная аминопептидаза			Источник фермента	Лит-ра
	k_{cat}, c^{-1}	K_m, mM	$k_{cat}/K_m \cdot 10^3, M^{-1} \cdot c^{-1}$	Степень очистки	k_{cat}, c^{-1}	K_m, mM	$k_{cat}/K_m \cdot 10^3, M^{-1} \cdot c^{-1}$		
<i>n</i> -Нитроанилид <i>L</i> -лейцина	48,3	64,5	0,75	280	60,5	62,5	0,97	Бык	Данная работа
β -Нафтил-амид <i>L</i> -лейцина	86,5	3,0	28,8	280				»	То же
	16	2,5	6,4	1846				»	[9]
	25	30	0,83	2000				»	[5]
	12	15	0,73	875				»	[6]

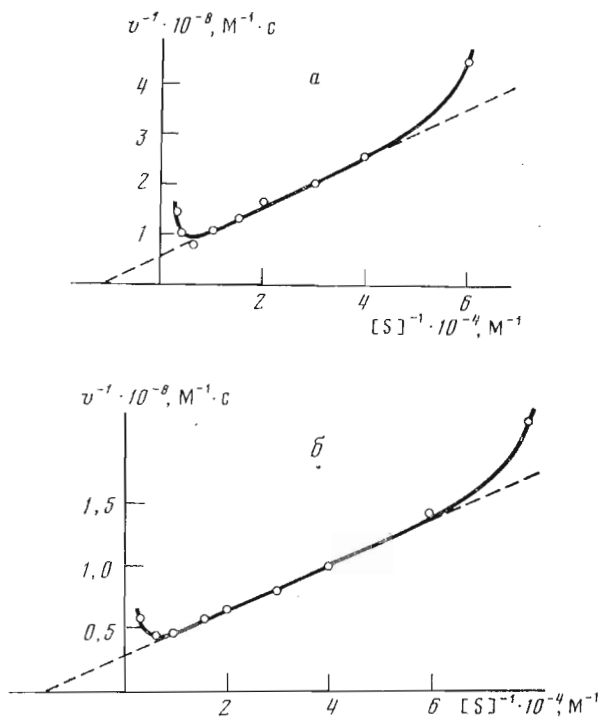
с результатами, приведенными для фермента из мозга обезьяны (M_r 100 000, отсутствие субъединичной структуры) и отличаются от соответствующих данных для фермента из мозга крысы (табл. 3).

Рассматривая интересующий нас вопрос о сходстве или различии растворимой и мембранной аминопептидаз, следует подчеркнуть, что ферменты по крайней мере из двух источников — быка и обезьяны — сходны по физико-химическим параметрам. На основании имеющейся у нас предварительной характеристики мембранной аминопептидазы из мозга крысы можно полагать, что приведенные в литературе для этого фермента данные о молекулярной массе и субъединичной структуре будут подвергнуты коррекции.

Далее было проведено сравнительное исследование некоторых энзиматических свойств выделенных нами растворимой и мембранной аминопептидаз. Установлено, что оба фермента эффективно гидролизуют *n*-нитроанилиды и β -нафтиламиды аминокислот, т. е. относятся к так называемым ариламидазам. Они имеют нерезко выраженный рН-оптимум активности в зоне рН 7,2.

Оба фермента, как и другие ранее исследованные аминопептидазы, полностью утрачивают активность в присутствии *o*-фенантролина (1 мМ), т. е. являются металлопептидазами.

Блокатор SH-групп, *n*-оксимеркурбензоат, снижает активность обеих аминопептидаз. Было проведено сравнительное исследование действия



Кинетика гидролиза *n*-нитроанилида *L*-лейцина растворимой (а) и мембранной (б) аминопептидазами мозга

реагента и определены константы скорости и инактивации исследуемых ферментов, которые оказались примерно одинаковыми — $(1,2-1,6) \cdot 10^6 M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Приведенные данные показывают, что для проявления активности аминопептидаз существенное значение имеет SH-группа.

С целью сравнения каталитической активности выделенных ферментов были определены кинетические параметры гидролиза *n*-нитроанилида *L*-лейцина (рН 7,2; 37° С). На рисунке приведены данные по кинетике гидролиза *n*-нитроанилида *L*-лейцина растворимой (а) и мембранной (б) аминопептидазами в координатах Лайнуивера — Берка. Для обоих ферментов графики имеют линейный вид в области концентраций субстрата от 20 до 100 мкМ; вне этой области наблюдаются отклонения от линейности. По линейной части графиков были определены кинетические константы, представленные в табл. 4. Видно, что величины констант для растворимой и мембранной аминопептидаз весьма близки.

Представляло интерес сравнить активность выделенных нами и описанных в литературе аминопептидаз, тем более что показатель очистки выделенного нами растворимого фермента был относительно невысок (табл. 1). Для мембранной аминопептидазы провести такое сравнение не представляется возможным, поскольку кинетические параметры гидролиза ариламидных субстратов этим ферментом в литературе отсутствуют. Для растворимой аминопептидазы из мозга крысы и быка данные по гидролизу β -нафтиламида *L*-лейцина имеются. Эти данные, а также параметры гидролиза этого субстрата выделенной нами растворимой аминопептидазой приведены в табл. 4. Видно, что основной показатель активности (k_{cat}/K_m) для выделенного нами фермента существенно выше, чем для описанного в литературе фермента из того же источника (для аминопептидазы из мозга крысы приводятся значительно более низкие показатели активности). В то же время показатели степени очистки для описанных в литературе ферментов выше, чем у нас. Это расхождение обусловлено тем, что исходный уровень активности в нашей и приводимых в литературе работах относится к различным начальным стадиям очистки фермента.

Суммируя приведенные выше данные, можно сделать заключение, что растворимая и мембранная аминоксипептидазы из мозга быка обладают сходными физико-химическими параметрами и сходными энзиматическими свойствами. Характеристика субстратной специфичности растворимой и мембранной аминоксипептидаз представлена в сообщении II.

Экспериментальная часть

В работе использовали DEAE-сефарозу CL-6B, аминоксипептидазу 4B, сефадекс G-200 (Pharmacia, Швеция); гидроксипатит (био-гель НТР, Bio-Rad, США); амфолиты pH 3,5-10 и 4-6 (ЛКВ, Швеция); наборы белков с известными молекулярными массами (Boehringer, Австрия); *n*-нитроанилид *L*-лейцина (Boehringer, Австрия); β -нафтиламид *L*-лейцина (Reanal, Венгрия); *o*-фенантролин (Chemapol, ЧССР); *n*-оксимеркурбензоат (Serva, ФРГ); трис (Fluka, Швейцария); EGTA (Sigma, США); дитиотреит и тритон X-100 (Calbiochem, США), додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), 2-меркаптоэтанол (Loba Chemie, Австрия).

Буферные растворы: А (50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,5) и Б (25 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,5, содержащий 2 мМ EGTA, 0,5 мМ дитиотреит и 0,04% NaN₃).

Выделение растворимой аминоксипептидазы. Все операции проводили при 4° С. 300 г серого вещества коры мозга быка гомогенизировали в 1 л буфера А, содержащего 1 мМ дитиотреит (буфер А'), в гомогенизаторе РТ-1 (1 мин, 4000 об/мин). Гомогенат центрифугировали (30 мин, 20 000g), к супернатанту добавляли 5% раствор стрептомицин-сульфата до концентрации 1%. Через 1 ч центрифугировали (30 мин, 20 000g) и к супернатанту добавляли сульфат аммония до 40% насыщения. Через 2 ч центрифугировали (30 мин, 20 000g), к супернатанту добавляли сульфат аммония до 70% насыщения и через 2 ч вновь центрифугировали (30 мин, 20 000g). Осадок растворяли в 100 мл буфера А', диализовали против 2 л того же буфера (16 ч, две смены буфера) и центрифугировали (20 мин, 40 000g).

Раствор наносили на колонку (4×16 см) с DEAE-сефарозой, уравновешенной буфером Б, промывали 300 мл буфера Б, белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0-0,35 М) в буфере Б (2××700 мл) со скоростью 90 мл/ч (объем фракции 15 мл). Фракции с аминоксипептидазной активностью ([NaCl]=0,22-0,25 М) объединяли и диализовали 3 ч против 800 мл буфера Б (три смены буфера). Раствор наносили на колонку (1,5×24 см) с аминоксипептидазой, уравновешенной буфером Б, промывали 60 мл буфера Б, содержащего 0,1 М NaCl, белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,1-0,7 М) в буфере Б (2×250 мл) со скоростью 25 мл/ч (объем фракции 5 мл). Фракции с аминоксипептидазной активностью ([NaCl]=0,35-0,40 М) объединяли, диализовали 3 ч против 600 мл буфера Б (три смены буфера). Раствор наносили на колонку (1×12,5 см) с гидроксипатитом, уравновешенным буфером Б, промывали 20 мл буфера Б, белки элюировали линейным градиентом концентрации фосфата натрия (0-0,2 М, pH 7,5) в буфере Б (2×100 мл) со скоростью 12 мл/ч (объем фракции 2 мл). Фракции с аминоксипептидазной активностью ([фосфат]=0,08-0,11 М) объединяли и диализовали 3 ч против 600 мл буфера Б. Раствор наносили на колонку (1×6,5 см) с аминоксипептидазой, уравновешенной буфером Б, промывали 10 мл буфера Б, содержащего 0,1 М NaCl, белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,1-0,9 М) в буфере Б (2×80 мл) со скоростью 10 мл/ч (объем фракции 2 мл). Фракции с аминоксипептидазной активностью ([NaCl]=0,37-0,42 М) объединяли и добавляли дитиотреит до концентрации 1,5 мМ.

Выделение мембранной аминоксипептидазы. Все операции, кроме солиubilизации, проводили при 4° С. Использовали мозг, хранившийся при -70° С в 10% сахарозе. Мембранную фракцию получали по методике [16]. 150 г серого вещества размораживали и гомогенизировали в 1,3 л 10% раствора сахарозы (гомогенизатор РТ-1, 1 мин, 4000 об/мин). Гомогенат

центрифугировали (10 мин, 1000g), супернатант центрифугировали (35 мин, 20 000g), осадок суспендировали в 1,4 л буфера А (осмотический шок) и центрифугировали (30 мин, 20 000g). Супернатант отбрасывали, осадок (мембранную фракцию) промывали путем суспендирования в 1,4 л буфера А и последующего центрифугирования (30 мин, 20 000g). Эту процедуру повторяли еще 2 раза; полученный осадок суспендировали в 190 мл 1% тритона X-100 в буфере А, инкубировали 45 мин при 37° С и центрифугировали (1 ч, 83 000g), осадок отбрасывали.

Солюбилизат наносили на колонку (4×16 см) с DEAE-сефарозой, уравновешенной буфером Б, промывали 300 мл буфера Б, белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0–0,35 М) в буфере Б (2×700 мл) со скоростью 90 мл/ч (объем фракции 15 мл). Фракции с аминопептидазной активностью ($[NaCl]=0,22–0,25$ М) объединяли и наносили на колонку (1,8×12,5 см) с гидроксиапатитом, уравновешенным буфером Б, промывали 45 мл буфера Б, белки элюировали линейным градиентом концентрации фосфата натрия (0–0,2 М, pH 7,5) в буфере Б (2×100 мл) со скоростью 12 мл/ч (объем фракции 2 мл). Фракции с аминопептидазной активностью ($[фосфат]=0,14–0,16$ М) объединяли и наносили на колонку (1×6,5 см) с аминоексил-сефарозой, уравновешенной буфером Б, промывали 10 мл буфера Б, содержащего 0,1 М NaCl, белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,1–0,8 М) в буфере Б (2×80 мл) со скоростью 10 мл/ч (объем фракции 2 мл). Фракции с аминопептидазной активностью ($[NaCl]=0,35–0,40$ М) объединяли.

Определение активности аминопептидаз проводили при 37° С. В кювету спектрофотометра Gilford 2400-2 (США) (длина оптического пути 1 см) помещали 1,5 мл буфера А и 50 мкл раствора фермента, инкубировали 10 мин, затем добавляли 60 мкл 2,5 мМ *n*-нитроанилида *L*-лейцина и регистрировали изменение оптической плотности при 405 нм во времени, $\Delta\epsilon$ 9620 М⁻¹·см⁻¹. За единицу активности принимали активность такого количества фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [17], используя реагент фирмы Bio-Rad (США).

Диск-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [18] (при оценке чистоты препаратов ферментов) или по методу Лэммли [19] (при определении молекулярной массы). В качестве белков-маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (M_r 68 000) и субъединицы РНК-полимеразы (M_r α – 39 000, β – 155 000, β' – 165 000). Окрашивание проводили кумасси ярко-синим R-250, столбики геля сканировали при 570 нм на спектрофотометре Gilford 2400-2.

Препаративное изоэлектрофокусирование в градиенте плотности раствора сахарозы проводили на приборе фирмы LKB (Швеция) по методике, рекомендованной в проспекте фирмы. В колонку объемом 110 мл вносили 0,1–1 мг фермента.

Определение молекулярных масс гелем-фильтрацией проводили на колонке с сефадексом G-200 (2,5×70 см), уравновешенным буфером Б, содержащим 0,1 М NaCl. При калибровке колонки использовали маркеры (в скобках – молекулярная масса): каталазу (240 000), альдолазу (158 000), бычий сывороточный альбумин (68 000), яичный альбумин (45 000), цитохром с (12 500).

Исследование кинетики гидролиза n-нитроанилида L-лейцина. Состав проб: концентрация фермента (0,5–1)·10⁻⁹ М, концентрация субстрата (1–50)·10⁻⁵ М, буфер А, объем пробы 1,5 мл, 37° С. Фермент преинкубировали 10 мин в буфере А, затем вносили субстрат и регистрировали изменение оптической плотности при 405 нм во времени на спектрофотометре Gilford 2400-2 в кюветах с длиной оптического пути 1 см; $\Delta\epsilon$ 9620 М⁻¹·см⁻¹.

Исследование кинетики гидролиза β -нафтиламида L-лейцина. Состав проб: концентрация фермента 2·10⁻¹⁰ М, концентрация субстрата (1–50)·10⁻⁶ М, буфер А, объем пробы 2 мл, 37° С. Фермент преинкубировали

10 мин в буфере А, затем вносили субстрат и регистрировали относительное изменение интенсивности флуоресценции при 440 нм (возбуждение при 335 нм) во времени на спектрофлуориметре Hitachi MPF-3 (Япония) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Концентрацию продукта реакции, β -нафтиламина, рассчитывали по калибровочной кривой.

Определение скорости инактивации аминопептидаз мозга *n*-оксимеркурбензоатом. Для удаления дитиотрейта препараты ферментов диализовали против 25 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5. Состав проб: концентрация ферментов $5 \cdot 10^{-10}$ М, концентрация субстрата $3,3 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация ингибитора $6,7 \cdot 10^{-8}$ М, буфер А, объем пробы 1,5 мл, 37° С. Фермент преинкубировали в буфере 10 мин, вносили субстрат и ингибитор и регистрировали изменение оптической плотности при 405 нм во времени на спектрофотометре Gilford 2400-2. По изменению величины остаточной активности ферментов во времени рассчитывали константы скорости инактивации, используя модифицированный метод Гугенгейма [20].

Ингибирование аминопептидаз *o*-фенантролином определяли, инкубируя фермент (концентрация 10^{-9} М) в присутствии 10^{-3} М фенантролина в буфере А (объем пробы 1,54 мл) 10 мин при 37° С. Затем вносили *n*-нитроанилид *L*-лейцина (10^{-4} М) и определяли остаточную активность фермента, как указано выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hambrook J. M., Morgan B. A., Rance M. G., Smith C. F. C. Nature, 1976, v. 262, № 5571, p. 782-783.
2. Marks N., Stern F., Kastin A. J., Coy D. H. Brain Res. Bull., 1977, v. 2, p. 491-493.
3. Burbach J. P. H., Lebouille J. M. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 3, p. 1487-1494.
4. Ротанова Т. В., Гаерилова Н. А., Колесанова Е. Ф., Гинодман Л. М., Антонов В. К. VI двусторонний симпозиум СССР - Франция «Структура и функция белков и нуклеиновых кислот». Цхалтубо, 1982, с. 120-121.
5. Schnebli H. P., Phillips M. A., Barclay R. K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 1, p. 89-98.
6. Wagner G. W., Tavianini M. A., Hermann K. M., Dixon J. E. Biochemistry, 1981, v. 20, № 13, p. 3884-3890.
7. Neidle A., Reith M. E. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 203, № 1, p. 288-295.
8. Suszkiw J. B., Brecher A. S. Biochemistry, 1970, v. 9, № 20, p. 4008-4017.
9. Hersh L. B., McKelvy J. F. J. Neurochem., 1981, v. 36, № 1, p. 171-178.
10. Neidle A., Lajtha A. В кн.: Вопросы биохимии мозга. Вып. II/Ред. Бунатян Г. Х. Ереван, 1976, с. 48-58.
11. Hayashi M., Oshima K. J. Biochem., 1977, v. 81, № 3, p. 631-639.
12. Traficante L. J., Rotrosen J., Siekierski J., Tracer H., Gershon S. Life Sci., 1980, v. 26, № 20, p. 1697-1706.
13. McDermott J. R., Smith A. J., Mantle D., Lauffart B. Regul. Pept., 1983, v. 7, № 3, p. 294.
14. Hui K.-S., Wang Y.-J., Lajtha A. Biochemistry, 1983, v. 22, № 5, p. 1062-1067.
15. Shimamura M., Hazato T., Katayama T. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 756, № 2, p. 223-229.
16. Knight M., Klee W. A. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 11, p. 3843-3847.
17. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1/2, p. 248-254.
18. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404-409.
19. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
20. Полежаев А. М., Баранов М. К., Лошадкин Н. А., Марков С. М. Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1965, т. 10, № 4, с. 467-469.

Поступила в редакцию
10.IX.1985

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SOLUBLE AND MEMBRANE-BOUND
BRAIN AMINOPEPTIDASES. I. ISOLATION, PHYSICO-CHEMICAL
PROPERTIES AND CATALYTIC ACTIVITY

KOLESANOVA E. F. *, ROTANOVA T. V., AMERIK A. Yu.,
GINODMAN L. M., ANTONOV V. K.

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

** Institute of Physiologically Active Compounds, Academy
of Sciences of the USSR, Chernogolovka*

The methods were worked out for isolating of the bovine brain soluble and membrane-bound aminopeptidases in highly purified state. One of the stages involved a biospecific-type chromatography on aminohexyl-Sepharose. Both enzymes were found to have equal molecular masses (ca. 100–107 kD) and isoelectric points (pI 4,6). None of the enzymes possessed a subunit structure. Both aminopeptidases were inactivated by *o*-phenanthroline and by an SH-reagent, *p*-hydroxymercuribenzoate. The catalytic constants for the hydrolysis of a specific substrate, *L*-leucine *p*-nitroanilide, were identical for the two enzymes. So far no differences in the physico-chemical or enzymatic properties of the soluble and membrane-bound enzymes were disclosed.