



УДК 577.152.341*1'14

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТВОРИМОЙ
И МЕМБРАННОЙ АМИНОПЕПТИДАЗ МОЗГА

II. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Ротанова Т. В., Колесанова Е. Ф., Дывак И. А.,
Шрам С. И., 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.*

Проведено сравнительное исследование субстратной специфичности растворимой и мембранной аминокептидаз из мозга быка. В качестве субстратов использованы серии *n*-нитроанилидов и β -нафтиламидов аминокислот, ди- и трипептиды с N-концевым остатком фенилаланина и биологически активный пентапептид [Leu⁵]энкефалин. Установлено, что ряды специфичности для растворимой и мембранной аминокептидаз при гидролизе исследованных субстратов совпадают, *n*-нитроанилиды аминокислот и пептиды примерно одинаково гидролизуются обеими аминокептидазами, β -нафтиламидные субстраты гидролизуются существенно более эффективно, чем *n*-нитроанилидные и пептидные. С учетом приведенных ранее данных о физико-химических свойствах ферментов сделано заключение, что растворимая и мембранная аминокептидазы из мозга быка весьма сходны, а возможно, даже идентичны. Обсуждается вопрос о роли аминокептидаз в регуляции функционирования нервной системы. Сопоставление специфичности аминокептидаз мозга и лейцинаминокептидазы хрусталика глаза позволило отнести эти ферменты к разным группам и наметить пути создания селективно действующих ингибиторов.

В предыдущем сообщении [1] были приведены данные о том, что растворимая и мембранная аминокептидазы из мозга быка обладают сходными физико-химическими свойствами и характеризуются близкими параметрами каталитической активности при гидролизе типичного ариламидного субстрата — *n*-нитроанилида *L*-лейцина.

Задача следующего этапа исследований состояла в сравнении субстратной специфичности выделенных аминокептидаз, поскольку имевшиеся в литературе ограниченные сведения по этому вопросу не позволяли провести такое сопоставление. Эти сведения относились к ферментам из разных источников и в ряде случаев были неоднозначными. Так, для некоторых растворимых аминокептидаз были определены кинетические параметры гидролиза β -нафтиламидов аминокислот [2–4]; для мембранных ферментов такие сведения отсутствовали. Данных о гидролизе *n*-нитроанилидных субстратов аминокептидазами мозга в литературе по существу не имелось, только в работе [2] были приведены кинетические параметры гидролиза *n*-нитроанилидов лейцина и тирозина растворимой аминокептидазой из мозга крысы. Сведения о способности аминокептидаз мозга гидролизовать ди- и трипептидные субстраты были весьма противоречивы [4–8]. Вместе с тем было установлено, что аминокептидазы мозга гидролизуют некоторые нейропептиды, в частности пентапептид энкефалин [2–6, 9–11].

С целью получения существенной дополнительной информации по сравнительной характеристике растворимой и мембранной аминокептидаз из одного источника (мозга быка) нами было проведено исследование субстратной специфичности этих ферментов при гидролизе *n*-нитроанили-

Кинетические параметры гидролиза *n*-нитроанилидов аминокислот
аминопептидазами мозга быка *

Субстрат (приведена аминокислота в <i>n</i> -нитроанилиде)	Растворимая аминопептидаза			Мембранная аминопептидаза		
	$K_m \cdot 10^6, M$	k_{cat}, c^{-1}	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$K_m \cdot 10^6, M$	k_{cat}, c^{-1}	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
Arg	25,0	24,1	0,96	25,0	52,4	2,09
Leu	64,5	48,3	0,75	62,5	60,5	0,97
Phe	68,0	38,0	0,56	56,0	33,4	0,60
Ala	143	44,6	0,31	161	40,7	0,25
Pro	469	2,0	0,0043	571	1,95	0,0034
Gly				1670	2,85	0,0017
Glu				Не гидролизуется		

* Здесь и в табл. 2 и 3 ошибка в определении констант не превышала 15%.

Таблица 2

Кинетические параметры гидролиза β -нафтиламидов аминокислот
аминопептидазами мозга быка

Субстрат (приведена аминокислота в β -нафтиламиде)	Растворимая аминопептидаза			Мембранная аминопептидаза		
	$K_m \cdot 10^6, M$	k_{cat}, c^{-1}	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$K_m \cdot 10^6, M$	k_{cat}, c^{-1}	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
Lys	2,8	132	47,8	3,4	96,0	28,2
Arg	4,0	50,4	12,6	6,6	83,0	12,6
Leu	3,0	86,5	28,5	4,4	53,0	12,0
Ala	40	140	3,50	37,7	75,3	2,0
Gly	130	24,3	0,187	—	—	0,037
Glu				Не гидролизуется		
Asp				То же		

дов и β -нафтиламидов ряда аминокислот, а также некоторых пептидных субстратов.

Гидролиз ариламидов аминокислот. Изучение кинетики гидролиза ариламидных субстратов (см. табл. 1, 2) позволяет установить ряды специфичности ферментов по отношению к аминокислотам.

Ранее было отмечено [4], что при гидролизе аминопептидазами мозга *n*-нитроанилида *L*-лейцина наблюдаются отклонения от кинетики Михаэлиса — Ментен: при высоких концентрациях субстрата активность ферментов тормозится. Такие же отклонения были обнаружены и при гидролизе *n*-нитроанилидов других аминокислот. Кинетические параметры k_{cat} и K_m определяли по линейной части графиков зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка.

В табл. 1 приведены сравнительные данные, характеризующие кинетику гидролиза *n*-нитроанилидов аминокислот. Видно, что кинетические параметры гидролиза каждого из исследованных субстратов обеими аминопептидазами весьма близки. Для обоих ферментов ряды специфичности по параметру k_{cat}/K_m характеризуются последовательностью

Arg > Leu > Phe > Ala > Pro >> Glu.

Таким образом, обе аминопептидазы мозга наиболее эффективно гидролизуют *n*-нитроанилиды аминокислот с объемистыми боковыми радикалами и не гидролизуют производные аминокислот с отрицательно заряженной боковой группой.

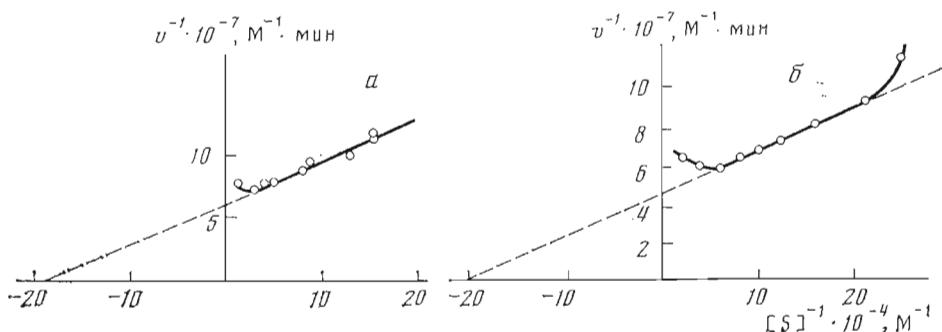
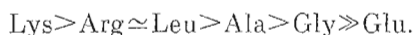


Рис. 1. Кинетика гидролиза β -нафтиламида *L*-лейцина растворимой (а) и мембранной (б) аминопептидазами мозга. Условия см. в «Экспер. части»

При гидролизе β -нафтиламидных субстратов, так же как и при гидролизе *n*-нитроанилидов, наблюдается торможение ферментов при высоких концентрациях субстратов. В качестве примера на рис. 1 приведены графики зависимости скорости от концентрации субстрата (в координатах Лайнуивера — Берка) для гидролиза β -нафтиламида *L*-лейцина аминопептидазами мозга. Видно, что оба графика сохраняют линейность только в зоне концентраций субстрата от $6 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ М; при более высоких концентрациях наблюдается ингибирование фермента.

Из приведенных в табл. 2 кинетических параметров гидролиза β -нафтиламидов аминокислот вытекает, что ряды специфичности для обоих ферментов по параметру k_{cat}/K_m одинаковы и характеризуются последовательностью



Таким образом, как и в случае *n*-нитроанилидных субстратов, наиболее предпочтительны β -нафтиламиды аминокислот с объемистыми боковыми цепями, производные же аминокислот с отрицательно заряженной боковой цепью аминопептидазами мозга не гидролизуются.

При рассмотрении данных табл. 2 необходимо отметить, что абсолютные значения k_{cat}/K_m , характеризующие гидролиз β -нафтиламидов аминокислот, несколько выше для растворимой аминопептидазы, чем для мембранной. Не исключено, что это отражает незначительное различие между ферментами.

Таким образом, можно констатировать, что при гидролизе ариламидных субстратов ферменты проявляют большое сходство: 1) ряды специфичности для растворимой и мембранной аминопептидаз при гидролизе как *n*-нитроанилидов, так и β -нафтиламидов аминокислот совпадают; 2) *n*-нитроанилиды аминокислот примерно одинаково эффективно гидролизуются обеими аминопептидазами; 3) оба фермента гидролизуют β -нафтиламидные субстраты более эффективно, чем *n*-нитроанилидные (ср. табл. 1 и 2).

На основании полученных данных можно дать объяснение представлениям, которые фигурировали в некоторых работах по исследованию аминопептидаз мозга млекопитающих. Было показано, что растворимая аминопептидаза в ряде случаев более эффективно расщепляет β -нафтиламид аланина, чем нафтиламиды других аминокислот. Это позволило сделать заключение о наличии в мозге аланин-ариламидазы. Но действительно ли существует аланин-ариламидаза? Из приведенных в табл. 2 данных следует, что при концентрациях субстратов порядка 10^{-4} М (а именно при таких концентрациях обычно сопоставляли эффективности гидролиза β -нафтиламидов аминокислот — см., например, [5 и 7]) наблюдается максимальная скорость гидролиза, *V*. Поскольку для гидролиза β -нафтиламида аланина величина константы k_{cat} (а следовательно, и *V*) является наибольшей по сравнению с величинами k_{cat} для других нафтиламидных субстратов (табл. 2), очевидно, что в этих условиях β -нафтиламид *L*-аланина окажется «наилучшим» субстратом, несмотря на то что величина

Кинетические параметры гидролиза пептидных субстратов аминопептидазами мозга быка

Субстрат	Растворимая аминопептидаза			Мембранная аминопептидаза		
	$K_m \cdot 10^3, M$	k_{cat}, c^{-1}	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, M$	k_{cat}, c^{-1}	$(k_{cat}/K_m) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
(I) Phe-Gly-OMe	270	42,0	0,156	500	87,5	0,175
(II) Phe-Ala-Ala-OH	370	212	0,580	200	136,0	0,680
(III) Phe-Ala-Ala-OMe	77	91,0	1,18	86	121	1,41
(IV) Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	100	154	1,54	83	152	1,83
([Leu ⁵]энкефалин)						

K_m для него весьма высока. При относительно низких концентрациях алалиновый субстрат существенно уступает лейциновому и тем более лизиновому. Эти соотношения хорошо выражены для растворимой аминопептидазы, подобная тенденция наблюдается и для мембранного фермента. Можно полагать поэтому, что постулированное ранее представление о наличии алалин-ариламидазы не является состоятельным.

Гидролиз пептидных субстратов. Как отмечалось в начале статьи, сведения о гидролизе ди- и трипептидных субстратов аминопептидазами мозга весьма противоречивы. При проведении сравнительного исследования субстратной специфичности аминопептидаз нами были использованы пептиды с N-концевым фенилаланином, что позволяло регистрировать отщепление N-концевого остатка спектрофотометрически (соединения (I) — (III), табл. 3). Другим субстратом служил биологически активный пентапептид [Leu⁵]энкефалин, о гидролизе которого судили по количеству освобождавшегося тирозина, определяемого методом ВЭЖХ; использовали меченый [[3,5-³H]Tyr, Leu⁵]энкефалин (соединение (IV), табл. 3).

Проведенные исследования позволили прежде всего дать ответ на упоминавшийся выше дискуссионный вопрос о способности аминопептидаз мозга гидролизовать короткие пептиды. Нами установлено, что обе аминопептидазы мозга весьма эффективно гидролизуют ди- и трипептидные субстраты. При гидролизе этих субстратов была отмечена некоторая аномалия, заключающаяся в том, что наблюдался значительный лаг-период процесса. Он был более выражен для дипептидного субстрата. Возможно, именно это обстоятельство и явилось причиной того, что в некоторых работах не был зарегистрирован гидролиз коротких пептидов аминопептидазами мозга.

Сравнительные данные по кинетике гидролиза метилового эфира фенилаланилглицина (I) в координатах Лайнуивера — Берка приведены на рис. 2. Как и в случае ариламидов аминокислот, видно весьма выраженное торможение при высоких концентрациях субстрата. Оно наблюдается и при гидролизе трипептидов (II) и (III). Кинетические константы k_{cat} и K_m определяли по линейным участкам графиков. При гидролизе энкефалина отклонений от кинетики Михаэлиса — Менпена отмечено не было.

Сводка кинетических параметров для пептидных субстратов приведена в табл. 3, из которой видно, что аминопептидазы мозга проявляют одинаковую специфичность при гидролизе исследованных пептидов. Для обоих ферментов можно отметить: 1) с увеличением длины пептидной цепи субстрата (соединения (I), (III) и (IV)) эффективность гидролиза повышается, и среди изученных пептидов наиболее хорошо гидролизуемым субстратом является [Leu⁵]энкефалин; 2) этерификация C-концевой карбоксильной группы в молекуле субстрата (соединения (II) и (III)) приводит к увеличению эффективности его гидролиза.

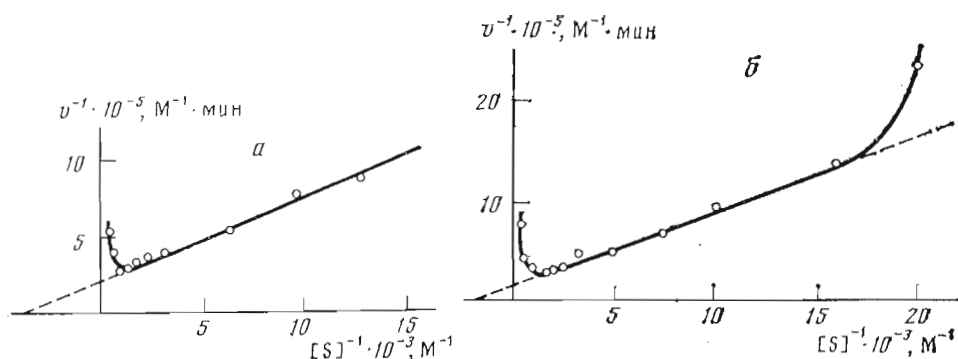


Рис. 2. Кинетика гидролиза метилового эфира фенилаланилглицина растворимой (а) и мембранной (б) аминопептидазами мозга. Условия см. в «Экспер. части»

Таким образом, при гидролизе как ариламидных, так и пептидных субстратов различий между растворимой и мембранной аминопептидазами мозга обнаружено не было. Учитывая приведенные ранее [1] сравнительные данные о физико-химических свойствах рассматриваемых ферментов, следует сделать заключение, что растворимая и мембранная аминопептидазы из мозга быка весьма сходны, а возможно, даже идентичны.

Как было отмечено ранее [1], аминопептидазы мозга играют доминирующую роль в деградации нейропептида энкефалина. Уровень энкефалина (как и вообще интермедиатов) в ткани мозга определяется двумя факторами: скоростью образования и скоростью деградации. При постоянной активности ферментов процессинга, обеспечивающих образование энкефалина, торможение активности аминопептидаз в результате действия ингибиторов должно приводить к повышению уровня нейропептида. Но как быстро может изменяться уровень энкефалина? Ориентировочный ответ на этот вопрос можно получить путем расчета потенциальной скорости обновления этого нейропептида *in vivo* в результате действия аминопептидаз. Такой расчет можно осуществить на основании данных о содержании аминопептидаз в мозге ($\sim 3 \cdot 10^{-7}$ М для растворимого фермента и $\sim 3 \cdot 10^{-8}$ М для мембранного [1]) и о величине k_{cat}/K_m ($\sim 1,5 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, табл. 3) при допущении о том, что пептид может беспрепятственно контактировать с ферментами. Поскольку в ткани мозга концентрация энкефалина значительно ниже величины K_m (табл. 3), скорость гидролиза пептида определяется упрощенным уравнением Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E][S]}{K_m} = k[S],$$

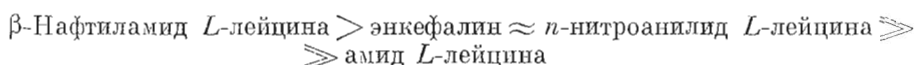
и гидролиз протекает в соответствии с кинетикой первого порядка. Величину константы скорости k , равную $k_{\text{cat}}[E]/K_m$, можно рассчитать по приведенным выше данным; она приблизительно равна $1,5 \cdot 10^6 \cdot 3 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, т. е. $0,5 \text{ с}^{-1}$; следовательно, период полураспада энкефалина должен составлять $\sim 1,4 \text{ с}$. Из расчета следует, что за несколько секунд должен обновляться весь пул энкефалина. Экспериментальных данных о скорости обновления энкефалина в ткани мозга в литературе не приводится. Полученные нами расчетные данные следует рассматривать как предельно возможные. В реальных же условиях скорость обновления пула нейропептида, вероятно, ниже по ряду причин. В частности, возможно, что в деградации энкефалина участвует только мембраносвязанная аминопептидаза; кроме того, контакт пептида с ферментом может быть ограничен. Вместе с тем можно полагать, что скорость обновления пула энкефалина достаточно высока; на таком фоне в результате изменения активности аминопептидаз легко могут осуществляться колебания уровня нейропептида, обеспечивающие быструю регуляцию соответствующих функциональных параметров нервной системы.

Сравнительные данные по специфичности аминокептидаз мозга и лейцинаминопептидазы хрусталика глаза быка

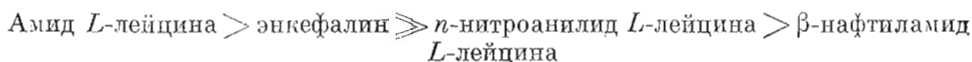
Субстрат	Аминокептидазы мозга (k_{cat}/K_m) · 10 ⁻⁶ , М ⁻¹ ·с ⁻¹	Лейцинаминопептидаза хрусталика (k_{cat}/K_m) · 10 ⁻⁶ , М ⁻¹ ·с ⁻¹
Амид L-лейцина	<0,01	0,73 [15]
Энкефалин	1,54–1,89	0,30
n-Нитроанилид L-лейцина	0,75–0,97	0,0007 [15]
β-Нафтиламид L-лейцина	12,0–28,5	0,0004 [15]

В связи с этим конструктивной задачей дальнейших исследований является создание эффективных ингибиторов аминокептидаз мозга. Поскольку в тканях млекопитающих идентифицировано значительное число различных аминокептидаз, предполагаемые ингибиторы должны обладать определенной селективностью. Поэтому представляло интерес сравнение специфичности аминокептидаз мозга и некоторых других достаточно охарактеризованных ферментов. Хорошо изученными ферментами являются лейцинаминопептидаза из хрусталика глаза быка [12] и сходная с ней лейцинаминопептидаза из почек [13, 14]; имеются данные о специфичности этих ферментов [12–15], определена первичная структура фермента из хрусталика глаза [16], в нашей лаборатории установлен тип катализа, осуществляемого этим ферментом [17], исследуется его пространственная структура [18].

В табл. 4 сопоставлены кинетические параметры (k_{cat}/K_m) для аминокептидаз мозга и лейцинаминопептидазы при гидролизе ряда типичных субстратов. Видно значительное различие между ферментами: аминокептидазы мозга наиболее эффективно гидролизуют β-нафтиламид лейцина, а лейцинаминопептидаза — амид лейцина. Вместе с тем рассматриваемые ферменты примерно одинаково эффективно гидролизуют нейропептид [Leu⁵]энкефалин. Ряд специфичности по приведенным субстратам для аминокептидаз мозга выглядит следующим образом:



Специфичность лейцинаминопептидазы хрусталика характеризуется «обратным» рядом:



В обоих рядах различие эффективностей гидролиза первого и последнего членов превышает три порядка.

Таким образом, среди функционирующих в организмах млекопитающих аминокептидаз можно выделить по крайней мере две группы: 1) ферменты, расщепляющие ариламины аминокислот с большей скоростью, чем амиды аминокислот («ариламидазы», представители — аминокептидазы мозга); 2) ферменты, для которых наиболее специфичными субстратами являются амиды аминокислот (представитель — лейцинаминопептидаза хрусталика).

Отмеченное различие в специфичности ферментов может служить одним из ориентиров при создании ингибиторов, обладающих определенной селективностью по отношению к аминокептидазам той или иной группы. Весьма вероятно, например, что соединения, содержащие ариламидную структуру, будут предпочтительно ингибировать ферменты группы ариламидаз. Если такие селективные ингибиторы будут созданы, это явится важной предпосылкой для выяснения физиологической роли различных групп аминокептидаз.

Экспериментальная часть

В работе использовали: *n*-нитроанилиды *L*-лейцина, *L*-аланина, *L*-фенилаланина, *L*-аргинина, *L*-пролина, глицина, *L*-глутаминовой кислоты, β -нафтиламиды *L*-лизина, *L*-аргинина, *L*-аланина, глицина, *L*-глутаминовой и *L*-аспарагиновой кислот, [Leu⁵]энкефалин, пуромидин (Serva, ФРГ); β -нафтиламид *L*-лейцина (Reanal, Венгрия); трис (Fluka, Швейцария); ацетонитрил (Merck, ФРГ); [[3,5-³H]Tyr, Leu⁵]энкефалин (36 Ки/ммоль; Amersham, Англия).

Бромгидрат Phe-Gly-ОМе и хлоргидрат Phe-Ala-Ala-ОМе синтезированы в лаборатории химии ферментов Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР [49], Phe-Ala-Ala-ОН был получен омылением метилового эфира трипептида.

Растворимую и мембранную аминопептидазы из мозга быка, гомогенные по данным электрофореза в полиакриламидном геле, с удельной активностью соответственно 22,6 и 15,1 ед./мг получали по ранее описанным методикам [4].

Лейцинаминопептидазу из хрусталика глаза быка (КФ 3.4.11.1) с уд. акт. 700 ед./мг получали по методике [12]. Перед кинетическими экспериментами фермент активировали при 37° С в присутствии ионов Mn²⁺, как указано [20].

Исследование кинетики гидролиза n-нитроанилидов аминокислот. Состав проб: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,5; концентрации ферментов (0,4–2) · 10⁻⁹ М; концентрации субстратов (0,8–200) · 10⁻⁵ М; объем пробы 1,5 мл, 37° С. Фермент инкубировали в буфере 10 мин, затем вносили субстрат и регистрировали изменение оптического поглощения при 405 нм во времени на спектрофотометре Gilford 2400-2 (США) в кюветах с длиной оптического пути 1 см; ϵ для *n*-нитроацетиллина 9620 М⁻¹ · см⁻¹.

Исследование кинетики гидролиза β -нафтиламидов аминокислот. Состав проб: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,5; концентрации ферментов (2–10) · 10⁻¹⁰ М; концентрации субстратов (0,8–100) · 10⁻⁶ М; объем пробы 2 мл, 37° С. Фермент инкубировали в буфере 10 мин, затем вносили субстрат и регистрировали относительное изменение интенсивности флуоресценции при 410 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.

Исследование кинетики гидролиза ди- и трипептидных субстратов. Состав проб: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,5 (для аминопептидаз мозга) или 8,5 (для лейцинаминопептидазы), концентрации ферментов (0,3–2,0) · 10⁻⁹ М, концентрации субстратов (0,1–20) · 10⁻⁴ М (запасные растворы: 0,1 М Phe-Gly-ОМе в буфере, 0,1 М Phe-Ala-Ala-ОН и Phe-Ala-Ala-ОМе в метаноле), 5 мМ MgCl₂ (только для лейцинаминопептидазы), объем пробы 1,5 мл, 37° С. Фермент инкубировали в буфере, затем вносили субстрат и регистрировали изменение оптического поглощения при 221 нм. Предварительно были определены $\Delta\epsilon$ при гидролизе пептидов: для Phe-Gly-ОМе — 1440, для Phe-Ala-Ala-ОН, — 1300, для Phe-Ala-Ala-ОМе — 1200 М⁻¹ · см⁻¹.

Исследование кинетики гидролиза [Leu⁵]энкефалина. Состав проб: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,5, концентрации ферментов (5–50) · 10⁻¹⁰ М, концентрации [[3,5-³H]Tyr, Leu⁵]энкефалина (0,08 Ки/ммоль) — (1–10) · 10⁻⁵ М, объем пробы 100 мкл, 37° С. Фермент инкубировали в буфере 10 мин, затем вносили субстрат, через 10 мин в аликвотах по 50 мкл останавливали реакцию гидролиза субстрата добавлением 5 мкл 30% HClO₄. Полученные пробы подвергали ВЭЖХ на колонке Ultrasphere, ODS, 5 мкм в системе 20% CH₃CN в 0,01% H₃PO₄ — (CH₃)₃N, рН 5. Радиоактивность фракций, содержащих [3,5-³H]тирозин и негидролизанный пептид, определяли с жидким сцинтиллятором на приборе Intertechnique SL-30 (Франция).

Кинетические параметры гидролиза субстратов рассчитывали методом наименьших квадратов. Ошибка не превышает 15%.

1. Колесанова Е. Ф., Ротанова Т. В., Америк А. Ю., Гинодман Л. М., Антонов В. К. *Биоорган. химия*, 1986, т. 12, № 3, с. 340–348.
2. Schnebli H. P., Phillips M. A., Barclay R. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 569, № 1, p. 89–98.
3. Wagner G. W., Tavianini M. A., Herrmann K. M., Dixon J. E. *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 13, p. 3884–3890.
4. Hersh L. B., McKelvy J. F. *J. Neurochem.*, 1981, v. 36, № 1, p. 171–178.
5. Hayashi M., Oshima K. *J. Biochem.*, 1977, v. 81, № 3, p. 631–639.
6. Hui K.-S., Wang Y.-J., Lajtha A. *Biochemistry*, 1983, v. 22, № 5, p. 1062–1067.
7. Suszkiw J. B., Brecher A. *Biochemistry*, 1970, v. 9, № 20, p. 4008–4017.
8. Wagner G. W., Dixon J. E. *J. Neurochem.*, 1981, v. 37, № 3, p. 709–713.
9. Traficante L. J., Rotrosen J., Sickierski J., Tracer H., Gershon S. *Life Sci.*, 1980, v. 26, № 20, p. 1697–1706.
10. McDermott J. R., Smith A. J., Mantle D., Lauffart B. *Regul. Pept.*, 1983, v. 7, № 3, p. 294.
11. Shimamura M., Hazato T., Katayama T. *Biochim. et biophys. acta*, 1983, v. 756, № 3, p. 223–229.
12. Hanson H., Frohne M. In: *Methods in Enzymology*. V. 45B/Ed. Lorand L. N. Y.: Acad. Press, 1976, p. 504–521.
13. Delange R. J., Smith E. L. In: *The Enzymes*. V. 3/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, p. 81–118.
14. Shen C.-C., Melius P. *Prep. Biochem.*, 1977, v. 7, № 3/4, p. 243–256.
15. Lasch J. *Ophthalmic Res.*, 1979, v. 11, p. 372–376.
16. Cuypers H. T., van Loon-Klaassen L. A. H., Vrec Egberts W. T. M., de Jong W. W., Bloemendal H. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 12, p. 7077–7085.
17. Антонов В. К., Явашев Л. П., Волкова Л. И., Садовская В. Л., Гинодман Л. М. *Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 9, с. 1427–1429.
18. Федоров А. А., Черная М. М., Строкопытов Б. В., Вольнова Т. В., Жданов А. С., Горюнов А. Н. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 10, с. 1321–1326.
19. Зинченко А. А., Руми Л. Д., Антонов В. К. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 8, с. 1122–1128.
20. *Enzymes and related biochemicals*. Worthington, 1978, p. 117–118.

Поступила в редакцию
10.IX.1985

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SOLUBLE AND MEMBRANE-BOUND BRAIN AMINOPEPTIDASES. II. SUBSTRATE SPECIFICITY

ROTANOVA T. V., KOLESANOVA E. F.*, DYVAK I. A.,
SHRAM S. I., 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*

Comparative studies on substrate specificity of the soluble and membrane-bound aminopeptidases from bovine brain were carried out. A series of *p*-nitroanilides and β -naphthylamides of amino acids, di- and tripeptides with the aminoterminal phenylalanine residue, as well as a biologically active pentapeptide — [Leu⁵]enkephalin — were used as substrates. The soluble and membrane-bound aminopeptidases manifested identical specificity towards the employed substrates. The aminopeptidases were equally effective towards the *p*-nitroanilides of amino acids and peptides, whereas β -naphthylamides were more susceptible to hydrolysis by both aminopeptidases than *p*-nitroanilides and peptides. Taking into account physico-chemical characteristics of these enzymes, it was concluded that the soluble and membrane-bound aminopeptidases are quite similar or perhaps identical. Their role in the regulation of nervous system functioning was discussed.

A comparison of specificities for brain aminopeptidases and leucine aminopeptidase from bovine lens led to the conclusion that they belong to different groups. This feature allows planning the synthesis of selective inhibitors.