



УДК 577.152.341\*6.01

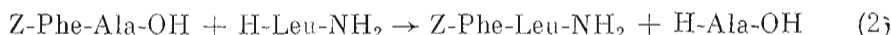
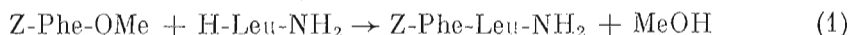
УСТАНОВЛЕНИЕ ТИПА КАТАЛИЗА ПРИ ФУНКЦИОНИРОВАНИИ  
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Y*Шонов А. А., Капитанников Ю. В., Руми Л. Д.,  
Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Методом транспептидации в тяжелоокислородной воде показано, что катализируемый карбоксипептидазой Y гидролиз сложноэфирных и пептидных субстратов происходит по нуклеофильному механизму с промежуточным образованием ацилфермента.

Карбоксипептидаза Y относится к интересной и до сих пор мало исследованной группе тиолзависимых сериновых карбоксипептидаз (КФ 3.4.16.1\*) [1]. Этот фермент привлекает особое внимание в связи с возможностью использования его в катализируемом протеиназами синтезе пептидов [1]. Известно, что карбоксипептидаза Y примерно с одинаковой эффективностью катализирует гидролиз сложноэфирных и пептидных субстратов. Представляется важным установить тип катализа, осуществляемого этим ферментом. Имеются лишь косвенные данные о том, что гидролиз сложноэфирных субстратов карбоксипептидазой Y происходит по нуклеофильному механизму с промежуточным образованием ацилфермента [2]. Для пептидных субстратов какие-либо данные о механизме катализа отсутствуют.

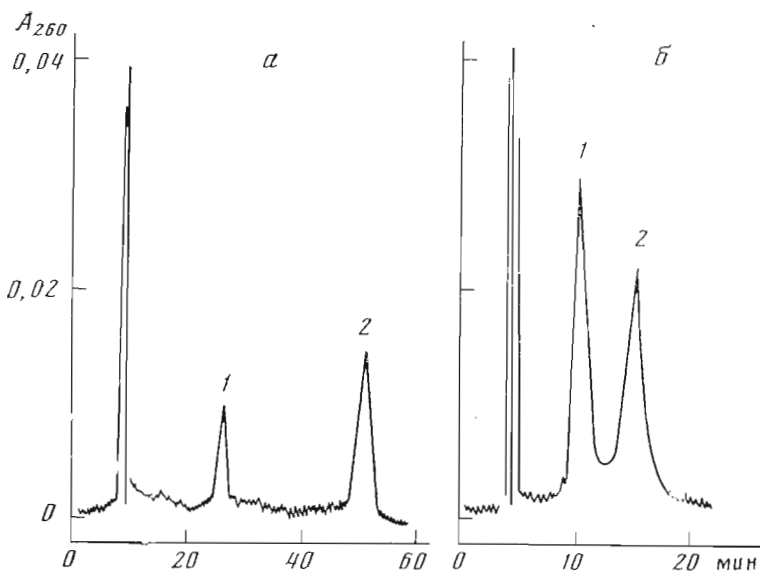
Чтобы установить механизм действия карбоксипептидазы Y, мы воспользовались одним из ранее разработанных в нашей лаборатории [3] методов, позволяющих различить ковалентный (нуклеофильный) и общий основной типы катализа протеолитическими ферментами даже в тех случаях, когда промежуточный ацилфермент не накапливается в системе. Как было подробно обосновано ранее, при нуклеофильном механизме катализа продукт катализируемой протеолитическим ферментом реакции ацильного переноса (транспептидации), осуществляемой в тяжелоокислородной воде  $H_2[^{18}O]$ , не должен содержать  $^{18}O$  в карбонильной группе расщепляемой пептидной связи [4].

Мы исследовали реакции ацильного переноса, в которых в качестве акцептора выступал амид лейцина, а в качестве донора — метиловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланина (реакция 1) или бензилоксикарбонилфенилаланил-аланин (реакция 2)



Z-Phe-OMe ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) и H-Leu-NH<sub>2</sub> (0,3 M) инкубировали с карбоксипептидазой Y ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) 1 ч (рН 9,0; 20° C) в среде  $H_2[^{18}O]$  в присутствии 20% диметилформаида. Реакцию останавливали подкислением реакционной смеси до рН 2. Продукты реакции разделяли методом ВЭЖХ (рисунок, а). Выделенный продукт ацильного переноса Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub> анализировали масс-спектрометрически на содержание  $^{18}O$ . Включение  $^{18}O$  из  $H_2[^{18}O]$  в продукт переноса не происходит (отсутствует пик с массой  $M + 2$ ). Это позволяет сделать вывод, что в ходе реакции, в которой в качестве донора выступает сложноэфирный субстрат, фермент функционирует по типу нуклеофильного катализа, т. е. с образованием ацилфермента.

\* Классификационный номер приведен в соответствии с Enzyme Nomenclature (1978).



Разделение компонентов реакции транспептидации, катализируемой карбоксипептидазой Y, методом ВЭЖХ. *а* — хроматограмма компонентов из реакции 1. Колонка Ultraspher ODS (250 × 4,6 мм, 5 мкм); элюент: CH<sub>3</sub>CN — 0,001 М фосфатный буфер (рН 7,0) (9 : 11); скорость элюции 1 мл/мин; наносимый объем — 25 мкл: 1 — Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub>, 2 — Z-Phe-OMe; *б* — хроматограмма компонентов из реакции 2. Колонка Zorbax C-8 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); элюент: CH<sub>3</sub>OH — H<sub>2</sub>O — TFA (50 : 50 : 0,1); скорость элюции 0,8 мл/мин; наносимый объем — 50 мкл: 1 — Z-Phe-Ala, 2 — Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub>.

Аналогичные данные были получены при исследовании механизма гидролиза пептидов. В этом случае в качестве субстрата использовали бензилоксикарбонилфенилаланил-аланин. Субстрат ( $1 \cdot 10^{-2}$  М) инкубировали с лейцинамидом (0,30 М) и карбоксипептидазой Y ( $5,5 \cdot 10^{-6}$  М) (рН 7,5; 20° С) в тяжелоокислородной воде. Выпадающий в осадок продукт реакции Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub> отделяли, дополнительно очищали методом ВЭЖХ (рисунок, *б*) и анализировали масс-спектрометрически.

Анализ масс-спектров показал, что исследуемое вещество не содержит изотопа <sup>18</sup>O, т. е. включения кислорода из воды в продукт переноса не происходит. Это свидетельствует о том, что при действии на пептидные субстраты карбоксипептидаза Y функционирует по типу нуклеофильного катализа.

Таким образом, при гидролизе как сложноэфирной, так и пептидной связи карбоксипептидаза Y функционирует по типу нуклеофильного (ковалентного) катализа, образуя с ацильной частью субстрата промежуточный ацилфермент.

### Экспериментальная часть

В работе использованы карбоксипептидаза Y отечественного производства, Z-Phe-OH, H-Ala-OH (Reanal, Венгрия), HCl-Leu-NH<sub>2</sub> (Serva, ФРГ), HCl-Ala-OMe (Fluka, Швейцария), тяжелоокислородная вода с содержанием <sup>18</sup>O 80 ат. % (отечественного производства). Все остальные реактивы марки х.ч.

Метиловый эфир карбобензоксифенилаланина получали обработкой Z-Phe-OH раствором метанола, насыщенным HCl. Получено светло-желтое масло;  $[\alpha]_D^{20} - 13,0^\circ$  (с 1,02, метанол), выход 80 %.

Амид бензилоксикарбонилфенилаланил-лейцина синтезировали из Z-Phe-OH и H-Leu-NH<sub>2</sub> методом смешанных ангидридов. Бесцветные кристаллы; т. пл. 191—193° С (этилацетат — петролейный эфир); выход 50 %.

Z-Phe-Ala-OH получали омылением соответствующего эфира. Т. пл. 151—152° С (вода — этанол); выход 60 %.

Реакция транспептидации с использованием в качестве субстрата Z-Phe-OMe (реакция 1). 0,6 мг (1,9 мкмоль) Z-Phe-OMe и 50 мг (0,3 ммоль)

HCl·Leu-NH<sub>2</sub> растворяли в 1 мл воды, содержащей 20% диметилформамида, добавляли 1 н. NaOH до pH 9 и инкубировали 1 ч (20° С) с 0,3 мг (5·10<sup>-6</sup> ммоль) карбоксипептидазы Y. По окончании реакции продукт выделяли методом ВЭЖХ (рисунок, а). Для отделения белка использовали предколонку (100 × 4,6 мм), заполненную сорбентом Zorbax C8 (5 мкм).

Реакция транспептидации с использованием в качестве субстрата Z-Phe-Ala-OH (реакция 2). К 3,7 мг (10 мкмоль) Z-Phe-Ala-OH и 50 мг (0,3 ммоль) HCl·Leu-NH<sub>2</sub> в 1 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,5, добавляли 0,34 мг (5,5·10<sup>-6</sup> ммоль) карбоксипептидазы Y. Образующийся осадок продукта — Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub><sup>1</sup> отфильтровывали, промывали на фильтре последовательно водой, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой. Затем осадок растворяли в 0,5 мл метанола и дополнительно очищали методом ВЭЖХ (рисунок, б).

Масс-спектрометрический анализ осуществляли на приборе Varian MAT 44S.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bai Y., Hayashi R. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 17, p. 8473—8479.
2. Martin B. M., Oliver R. W. A., Johansen J. T., Viswanatha T. Carlsberg Res. Commun., 1980, v. 45, p. 69—78.
3. Antonov V. K., Ginodman L. M., Rumsh L. D., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova A. G., Volkova L. I. Eur. J. Biochem., 1981, v. 117, p. 195—200.
4. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Румш Л. Д., Капитанников Ю. В., Баршевская Т. Н., Явашев Л. П., Гурова Л. Г., Волкова Л. И. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 436—445.

Поступила в редакцию  
12.IX.1985

#### ELUCIDATION OF THE CATALYSIS TYPE FOR CARBOXYPEPTIDASE Y FUNCTIONING

POPOV A. A., KAPITANNIKOV YU. V., RUMSH L. D., ANTONOV V. K.

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

Transpeptidation in heavy oxygen water H<sub>2</sub>[<sup>18</sup>O] showed that hydrolysis of ester and peptide substrates catalyzed by carboxypeptidase Y proceeded via nucleophilic mechanism with formation of an intermediate acyl enzyme.