



УДК 577.112 : 577.152.341*61.03

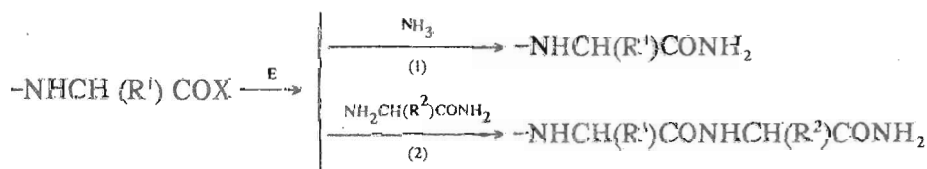
© 1993 Т. Н. Амосова, А. А. Попов, Н. Е. Кудрявцева,
Ю. В. Капитанников, Л. Д. Руми, В. К. Антонов

АМИДИРОВАНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Y

Институт биоорганической химии им. М. М. Шегмякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Исследована катализируемая нативной и модифицированной карбоксипептидазой Y реакция ацильного переноса остатков ациламино кислот и пептидов с соответствующих эфиров на аммиак. Показано, что использование модифицированных препаратов карбоксипептидазы Y позволяет значительно увеличить выход целевого амида. Из кальцитонина-Leu получен кальцитонин человека.

Ранее нами было исследовано образование ряда амидов ациламино кислот и ацилдипептидов из соответствующих метиловых эфиров [1] с помощью катализируемой карбоксипептидазой Y реакции транспептидации с использованием в качестве акцептора аммиака. Имеется две принципиальные возможности использования реакции транспептидации для синтеза амидов — перенос ацильного остатка с эфира или пептида на аммиак (1) или амид аминокислоты (2).



где X = —OCH₃— или —NHCH(R³)COOH.

При этом было показано, что выход целевого амида в отдельных случаях достигал 90%. Однако при амидировании некоторых эфиров пептидов и ациламино кислот выход был существенно ниже вследствие главным образом гидролиза исходных субстратов.

Данная работа — продолжение цикла работ по амидированию белков и пептидов карбоксипептидазой Y с целью получения биологически активных соединений.

Прежде всего, учитывая, что реакция амидирования проводится при концентрации NH₄Cl, равной 4 М, представлялось интересным определить влияние высокой ионной силы на ферментативную активность карбоксипептидазы Y. В связи с этим было изучено влияние высокой концентрации хлористого натрия на кинетические параметры реакции гидролиза этилового эфира N-ацетилтирозина (АТЭЕ), катализируемой нативной карбоксипептидазой Y. Показано (табл. 1), что присутствие соли в высокой концентрации приводит к некоторому понижению значения K_m, тогда как величина k_{кат} остается без изменений. Отсюда можно

Таблица 1

Кинетические параметры катализируемого карбоксипептидазой Y и Hg²⁺-карбоксипептидазой Y гидролиза АТФЕ в присутствии (а) и в отсутствие (б) 4 М NaCl (рН 9,5)

Карбоксипептидаза	$K_m \cdot 10^3, M$		$k_{кат}, c^{-1}$		$k_{кат}/K_m, M^{-1}c^{-1}$	
	а	б	а	б	а	б
Нативная	1,33	1,08	11,6	11,6	8774	10 740
Модифицированная	2,5	0,42	9,1	1,43	3624	3404

Таблица 2

Амидирование пролинсодержащих пептидов

Субстрат	Продукт реакции	Время реакции, мин	Выход, %	
			амида	продукта гидролиза
ZProOMe	ZProNH ₂	1200	15	60
ZAlaProOMe	ZAlaProNH ₂	1200	48	32
ZAlaProLeu	ZAlaProNH ₂	22	66	0

заключить, что высокая ионная сила практически не влияет на активность карбоксипептидазы Y.

Условия переноса остатков ациламинокислот с эфиров на аммиак выбирали так, чтобы снизить до минимума ферментативный гидролиз образующегося амида. Поскольку эстеразная и пептидазная активности карбоксипептидазы Y имеют различные рН-оптимумы, а именно, в щелочной среде наблюдается низкая амидазная активность при достаточно высокой эстеразной [2], реакцию транспептидации осуществляли при рН 9,2—9,5. Из полученных ранее результатов [1] можно сделать вывод, что выход конечного амида зависит от природы находящейся в P₁-положении аминокислоты. Выход продуктов реакции транспептидации падает в ряду Phe, Ala > Glu > Met > Tyr > Gly. При этом в некоторых случаях невысокий выход амида объясняется тем, что значительная часть субстрата гидролизуеться с образованием ациламинокислоты. Например, при амидировании BocTyrOMe [1] в течение 5 мин образуется лишь 26% BocTyrNH₂, остальные 74% составляет BocTyrOH. Следует отметить, что специфичность карбоксипептидазы Y в реакции транспептидации существенно отличается от специфичности фермента в реакциях гидролиза эфиров N-ациламинокислот.

В дальнейших исследованиях по амидированию ацилпептидов мы использовали субстраты, содержащие в положении P₁ остаток Pro. Выбор этих субстратов обусловлен тем, что последовательность -AlaProNH₂ является C-концевой частью кальцитонина человека [3]. В случае ZProOMe даже при продолжительной инкубации выход соответствующего амида составляет всего 15% (табл. 2). В то же время увеличение длины субстрата на одну аминокислоту существенно сказывается на выходе амида. Перенос ZAlaPro- с ZAlaProOMe на аммиак давал более высокий выход целевого продукта. Лучший результат может быть достигнут при использовании в качестве субстрата ZAlaProLeu, при этом почти в 60 раз сокращается время реакции и не происходит образования ацилдипептида (ZAla-ProOH).

Амидирование эфиров N-ацилдипептидов

Субстрат	Время реакции, мин	Продукт реакции амидирования	Выход, %	
			амида	продукта гидролиза
ZPheLeuOMe	120	ZPheLeuNH ₂	0	100
ZPheAlaOMe	120	ZPheAlaNH ₂	0	95
ZGlyLeuOMe	120	ZGlyLeuNH ₂	41	26

Таким образом, увеличение длины субстрата приводит к существенному повышению эффективности реакции амидирования, что, вероятно, связано с проявлением вторичной специфичности фермента в отношении субстрата.

Учитывая вышесказанное, представлялось интересным исследовать амидирование метиловых эфиров N-ацилдипептидов. В качестве субстратов были выбраны соединения, эффективно атакуемые карбоксипептидазой Y — ZPheLeuOMe и ZPheAlaOMe, а также медленно расщепляемый субстрат ZGlyLeuOMe.

Как видно из табл. 3, хорошо гидролизующиеся субстраты практически полностью подвергаются расщеплению с образованием свободной карбоксильной группы. Аналогичные результаты были получены ранее при попытке амидирования BocTyrOMe [1]. Субстрат ZGlyLeuOMe в тех же условиях превращается в целевой амид с выходом 41%.

Из полученных результатов можно сделать заключение, что перенос ацильной части легко гидролизующихся субстратов на аммиак в присутствии карбоксипептидазы Y протекает неэффективно, так как реакция идет главным образом в направлении гидролиза исходного субстрата.

Имеющиеся в литературе данные [4—6] свидетельствуют о том, что модификация различных остатков аминокислот, входящих в область активного центра карбоксипептидазы Y, приводит к избирательному подавлению пептидазной активности; при этом эстеразная активность остается практически без изменения. На следующем этапе работы была исследована эффективность модифицированной различными способами карбоксипептидазы Y в реакциях амидирования.

Предварительно было исследовано влияние высокой концентрации соли на ферментативную активность модифицированной карбоксипептидазы Y. Видно (табл. 1), что в случае Hg²⁺-модифицированной карбоксипептидазы Y величины K_m и $k_{кат}$ уменьшаются примерно в 6 раз, но соотношение $k_{кат}/K_m$ остается практически неизменным, т. е., как и в случае нативной карбоксипептидазы Y, высокая ионная сила не оказывает существенного влияния на фермент.

В ходе исследования фермент модифицировали ионами ртути, меди, перекисью водорода. Из табл. 4 видно, что применение модифицированного фермента во всех рассмотренных случаях позволяет резко увеличить выход целевого амида из тех субстратов, которые практически полностью подвергались гидролизу нативной карбоксипептидазой Y (ср. табл. 2, 3). Увеличение выхода происходит главным образом за счет подавления реакции гидролиза. Так, например, при использовании карбоксипептидазы Y, модифицированной по остатку метионина, при амидировании BocTyrOMe с 90% выходом образуется BocTyrNH₂. ZPheLeuOMe удастся превратить в ZPheLeuNH₂ с выходом 65%, используя ртутьмодифицированную карбоксипептидазу Y. Образование свободной ациламинокислоты при этом не наблюдалось. При попытке же амидирования

Перенос ацильных остатков эфиров N-ациламинокислот и пептидов на аммиак, катализируемый модифицированными препаратами карбоксипептидазы Y в условиях реакции транспептидации

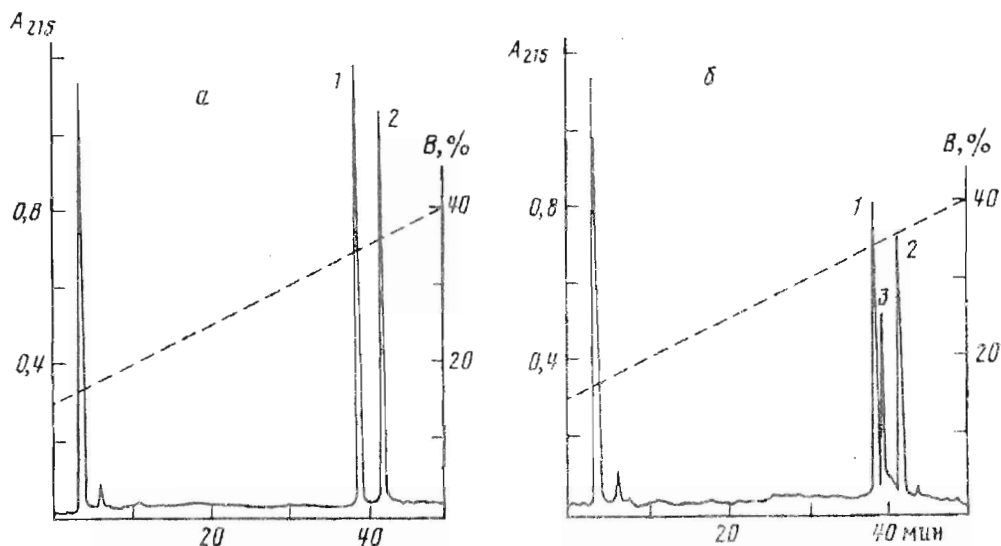
Субстрат	Образующийся амид	Время реакции, мин	Выход, %	
			амида	продукта гидролиза
Модификация Hg ²⁺ [4]				
ZPheLeuOMe	ZPheLeuNH ₂	60	65	0
ZPheAlaOMe	ZPheAlaNH ₂	5	24	58
BocTyrOMe	BocTyrNH ₂	40	51	12
AlaAspGlyLeuPheValOMe	AlaAspGlyLeuPheValNH ₂	15	100	0
Модификация по остатку метионина перекисью водорода [5]				
ZPheAlaOMe	ZPheAlaNH ₂	5	33	48
ZPheLeuOMe	ZPheLeuNH ₂	60	39	5
BocTyrOMe	BocTyrNH ₂	10	90	10
Модификация Cu ²⁺ [6]				
ZPheAlaOMe	ZPheAlaNH ₂	120	35	65
ZPheLeuOMe	ZPheLeuNH ₂	100	16	0
BocTyrOMe	BocTyrNH ₂	20	63	35
ZAlaProOMe	ZAlaProNH ₂	9600	72	4
ZAlaProLeuOH	ZAlaProNH ₂	1320	59	0

ZPheLeuOMe нативной карбоксипептидазой Y субстрат полностью подвергся гидролизу (табл. 3).

Интересными представляются результаты, полученные при амидировании пролинсодержащего пептида ZAlaProOMe медьмодифицированной карбоксипептидазой Y: при значительно большем времени реакции оказалось возможным достижение более высокого выхода амида (72%) за счет подавления реакции гидролиза (образование ZAlaProOH составляет в этом случае всего 4% по сравнению с 32% при использовании нативной карбоксипептидазы Y). Применение модифицированной карбоксипептидазы Y для амидирования ZAlaProLeuOH не дает никаких преимуществ по сравнению с нативным ферментом (ср. табл. 2). Как и следовало ожидать, в этом случае за счет снижения пептидазной активности значительно замедляется скорость реакции и практически тот же выход ZAlaProNH₂ достигается за существенно более длительный период (1320 мин по сравнению с 22 мин для нативного фермента).

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что использование изученных образцов модифицированной карбоксипептидазы Y в ряде случаев значительно увеличивает выход целевого амида, причем оптимальный способ модификации отличается для разных субстратов.

В заключительной части работы нами было осуществлено получение кальцитонина человека. В качестве предшественника был использован кальцитонин-Leu, учитывая, что при использовании для реакции амидирования пептидных субстратов, моделирующих C-концевую последовательность кальцитонина, наилучшие результаты были получены с ZAlaProLeu (см. табл. 2). Реакцию амидирования проводили с кальцитонином-Leu, имеющим S-S-мостик между Cys-1 и Cys-7, при pH 9,5 в 40% диметилсульфоксиде и температуре 35° C в течение 30 мин. По окончании инкубации реакцию останавливали подкислением реакционной смеси концентрированной муравьиной кислотой. Реакционную смесь



Амидирование кальцитонина-Leu карбоксипептидазой Y: а — смесь стандартов, б — реакционная смесь по окончании реакции; 1 — кальцитонин, 2 — кальцитонин-Leu, 3 — неидентифицированный продукт

анализировали с помощью ВЭЖХ. Полученные результаты (рисунок) свидетельствуют о том, что за время инкубации исходный кальцитонин-Leu превращается в кальцитонин (выход около 30%) и в неидентифицированный продукт, вероятно являющийся кальцитонином со свободной карбоксильной группой.

Экспериментальная часть

Использовали карбоксипептидазу Y (КФ 3.4.16.1) из пекарских дрожжей (НПО «Биолар», Олайне) с M_r 59 кДа и активностью около 40 ед./мг белка по этиловому эфиру N-ацетилтирозина [7], аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия). Все пептиды получены карбодимидным методом. Реакции амидирования, катализируемые карбоксипептидазой Y, анализ исходных соединений, реакционной смеси и промежуточных продуктов проводили методом ВЭЖХ в условиях, указанных в работе [1].

Применяли кальцитонин человека фирмы Serva, кальцитонин-Leu синтезирован в лаборатории химии пептидов ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Модификация карбоксипептидазы Y ионами ртути [4]. К 100 мкл 0,11 мМ раствора фермента в воде добавляли 10 мкл 0,5 М HEPES-буфера, pH 7,5, и 10 мкл 2 мМ водного раствора $HgCl_2$. Смесь инкубировали 15 мин при 20° С и 8 ч при 0° С.

Модификация карбоксипептидазы Y H_2O_2 по остатку метионина [5]. К 2 мл 0,38 М H_2O_2 в воде добавляли 62,4 мг NaH_2PO_4 , значение pH доводили до 4,75. К 40 мкл этого раствора добавляли 40 мкл 0,11 мМ раствора карбоксипептидазы Y в воде и инкубировали 2,5 ч при 20° С.

Модификация карбоксипептидазы Y ионами Cu^{2+} [6]. К 30 мкл 0,11 мМ раствора карбоксипептидазы Y в воде добавляли 30 мкл 0,2 мМ водного раствора $CuSO_4$.

Амидирование кальцитонина-Leu осуществляли в 4,5 М растворе аммиака, полученном добавлением раствора NaOH к 5 М раствору NH_4Cl до pH 9,5. К 1 мг кальцитонина-Leu в 164 мкл 40% диметилсульфоксида в аммиаке добавляли 164 мкл карбоксипептидазы Y (3,5 мг/мл в растворе аммиака) и 1,4 мл раствора аммиака. После инкубации полученной смеси при 37° С в течение

30 мин реакцию останавливали добавлением 270 мкл концентрированной муравьиной кислоты.

Анализ реакционной смеси осуществляли на колонке МНТП ЭЛСИКО — Силасорб С-18 (4×250 мм, 10 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (В) в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость потока 1 мл/мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капитанников Ю. В., Попов А. А., Шимбаревич Е. В., Румш Л. Д., Антонов В. К. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 797—801.
2. Hayashi R., Bai Y., Hata T. // J. Biochem. 1975. V. 77. № 1. P. 69—79.
3. Мышкина Л. А., Коротаев Г. К., Давидович Ю. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1589—1601.
4. Breddam K. // Carlsberg Res. Commun. 1983. V. 48. P. 9—19.
5. Breddam K. // Carlsberg Res. Commun. 1984. V. 49. P. 627—638.
6. Hayashi R., Bai Y., Hata T. // J. Biochem. 1975. V. 77. № 6. P. 1313—1318.
7. Hayashi R. // Methods Enzymol. 1976. V. 45. P. 568—587.

Поступила в редакцию
8.X.1992

*T. N. Amosova, A. A. Popov, N. E. Kudryavtseva, Yu. V. Kapitannikov,
L. D. Rumsh, V. K. Antonov*

AMIDATION OF PROTEINS AND PEPTIDES BY CARBOXYPEPTIDASE Y

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The native and modified carboxypeptidase Y-catalyzed reaction of acyl transfer of acylamino acid and peptide residues from the corresponding esters to ammonia was studied. Use of the modified carboxypeptidase Y increased the yield of the resulting product. Calcitonin-Leu was transformed into human calcitonin.