



УДК 577.156.072

**ТРИПСИНОПОДОБНЫЙ ФЕРМЕНТ ИЗ СЕМЯН РЖИ.  
НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ***Дунаевский Я. Е., Кожанцев В. Н., Белозерский М. А.**Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Из семян ржи выделен протосолилитический фермент, гидролизующий синтетический субстрат *n*-нитроанилид  $N^{\alpha}$ -бензоил-*DL*-аргинина (БАПАаза). Фермент очищен в 280 раз и гомогенен по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии и в отсутствие додецилсульфата натрия, при изоэлектрическом фокусировании в полиакриламидном геле и по данным седиментационного анализа. Его  $M \sim 64\ 000$ ,  $s_{20, w} = 4,4 S$ , изоэлектрическая точка 4,5. Фермент полностью ингибировался диизопропилфторфосфатом и тозиллизилхлорметилкетонем и не ингибировался тозилфенилаланилхлорметилкетонем. Изучение специфичности действия БАПАазы на синтетических субстратах показало, что фермент расщепляет пептидные, эфирные и амидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина. При исследовании действия фермента на некоторые белки было обнаружено заметное расщепление протаминов и слабое — казеина. На основании полученных данных делается вывод о принадлежности БАПАазы из семян ржи к протеолитическим ферментам типа трипсина.

Протеолитические ферменты  $N^{\alpha}$ -бензоил-*DL*-аргинил-*n*-нитроанилидазы (БАПАазы), расщепляющие *n*-нитроанилид  $N^{\alpha}$ -бензоил-*DL*-аргинина, широко распространены и обнаружены в семенах многих растений [1—8]. В течение последних лет они стали привлекать внимание исследователей и им посвящено уже несколько десятков работ. Однако эти ферменты остаются плохо изученными в отношении природы активных центров, субстратной специфичности и других свойств. В большинстве работ, посвященных БАПАазам, не уделялось достаточного внимания доказательству их гомогенности и отсутствия примесей других протеолитических ферментов. В связи с этим дальнейшие исследования по выделению БАПАаз в чистом виде и изучению их свойств представляют большой интерес.

В настоящей работе излагаются результаты наших работ по очистке БАПАазы из семян ржи, изучению некоторых ее свойств и субстратной специфичности.

Для выделения БАПАазы мы разработали метод, включающий экстракцию муки семян ржи водой, хроматографию на DEAE-сефадексе А-50, фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-75 и диализ против дистиллированной воды [9]. Однако выделенный таким образом препарат фермента не был гомогенным: он давал две-три полосы при электрофорезе в полиакриламидном геле и асимметричный пик на шпирен-диаграммах при аналитическом ультрацентрифугировании. С целью дальнейшей очистки препарат фермента после стадии гель-фильтрации на сефадексе G-75 подвергли препаративному электрофорезу в блоке полиакриламидного геля. В результате был получен препарат

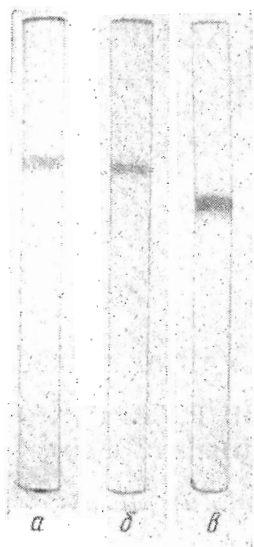


Рис. 1. Электрофорез в отсутствие (а) и в присутствии (б) додецилсульфата натрия и изоэлектрофокусирование (в) БАПАазы в полиакриламидном геле

БАПАазы с удельной активностью 2300 ед. на 1 мг белка с выходом по активности 4%. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии и в отсутствие додецилсульфата натрия, а также при изоэлектрическом фокусировании в полиакриламидном геле (градиент рН от 4 до 6) выделенная БАПАаза давала одну четкую зону (рис. 1). Чистота препарата фермента была подтверждена также методом аналитического ультрацентрифугирования (рис. 2) — небольшое количество медленно оседающего вещества, как показали контрольные опыты, представляют, очевидно, вещества, элюирующиеся из самого полиакриламидного геля.

Фермент имел коэффициент седиментации  $s_{20,w} = 4,4 S$ , который можно считать константой седиментации вследствие низкой концентрации белка в растворе — 45 мкг/мл. Молекулярный вес фермента, определенный методами ТСХ на сефадексе G-150 («сверхтонкий») и посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составлял 63 000 и 64 000 соответственно (рис. 3). Изоэлектрическая точка БАПАазы, по данным изоэлектрического фокусирования, находится при рН 4,5.

Изучение влияния ингибиторов и активаторов протеолитических ферментов показало, что выделенная БАПАаза полностью ингибировалась диизопропилфторфосфатом и хлорметилкетонотозиллизина, хлорметилкетон тозилфенилаланина не влиял на активность фермента (табл. 1). Соевый ингибитор трипсина и тразилол (ингибитор трипсина из легких крупного рогатого скота) не изменяли активность БАПАазы. Существенная инактивация фермента наблюдалась при действии *n*-хлормеркурибензоата, *N*-этилмалейнимиды и иодацетамида; цистеин и 2-меркаптоэтанол не изменяли активность исходного фермента. Согласно полученным данным, БАПАаза — трипсиноподобный протеолитический фермент серинового типа. Сульфгидрильная группа фермента, на которую действуют указанные SH-реагенты, очевидно, не входит в каталитический центр фермента. Об этом свидетельствует отсутствие полного ингибирования фермента даже при использовании больших концентраций SH-реагентов.

Для выяснения субстратной специфичности БАПАазы мы изучали ее действие на целый ряд синтетических субстратов. Опыты показали (табл. 2), что фермент гидролизует пептидные, амидные и эфирные связи, в об-

Таблица 1

Действие ингибиторов и активаторов на активность БАПАазы

Реагенты	Концентрация, М	Остаточная активность, %
2-Меркаптоэтанол	$2,5 \cdot 10^{-2}$	100
Дитиотреитол	$1,25 \cdot 10^{-3}$	100
ЭДТА	$5 \cdot 10^{-3}$	100
Цистеин	$5 \cdot 10^{-2}$	100
<i>n</i> -Хлормеркурибензоат	$2,6 \cdot 10^{-4}$	10
<i>N</i> -этилмалейнимид	$5 \cdot 10^{-1}$	33
Иодацетамид	$5,2 \cdot 10^{-4}$	40
Диизопропилфторфосфат	$5 \cdot 10^{-5}$	0
Хлорметилкетон тозиллизина	$3 \cdot 10^{-5}$	0
Хлорметилкетон тозилфенилаланина	$3 \cdot 10^{-5}$	100



Рис. 2. Седиментационные диаграммы очищенного препарата фермента. Скорость вращения ротора 56 100 об/мин, концентрация белка 45 мкг/мл. Снимки сделаны через 33 мин (а) и через 94 мин (б) после достижения полной скорости

разовании которых принимают участие карбоксильные группы остатков аргинина и лизина, при условии, что в гидролизуемых субстратах N- и C-концевые группы остатков аминокислот защищены. БАПАаза имеет, очевидно, большее сродство к остаткам аргинина, чем к остаткам лизина; об этом говорят скорости расщепления соответствующих субстратов. При одинаковых концентрациях *n*-нитроанилидов бензоил-*DL*-аргинина и бензоил-*DL*-лизина начальная скорость гидролиза первого субстрата была в 2,5 раза больше, чем скорость гидролиза второго. Константы Михаэлиса, определенные при гидролизе ферментом этилового эфира бензоил-*L*-аргинина и метилового эфира тозил-*L*-аргинина, равнялись соответственно  $6,1 \cdot 10^{-4}$  и  $1,1 \cdot 10^{-4}$  М (рис. 4).

Опыты по изучению расщепления БАПАазой ряда белков, в том числе и выделенных из семян ржи, свидетельствуют о том (табл. 2), что БАПАаза не гидролизует бычий сывороточный альбумин, лизоцим, суммарный гистон из зубной железы телят, а также белки семян ржи: альбумины, глобулины, глиадины и глютенины. Фермент слабо гидролизовал казеин и хорошо — протамин: прирост оптической плотности при 420 нм за 4 ч гидролиза составлял для казеина 0,180, для протамина — 0,800 и был практически равен нулю для всех других использованных белков. Ингибирование фермента диизопропилфторфосфатом приводило к полному прекращению гидролиза БАПАазой синтетических субстратов (*n*-нит-

Таблица 2

Гидролиз БАПАазой синтетических субстратов и белков \*

Синтетические субстраты		Синтетические субстраты		Белки	Белки
Ac-Tyr-Et	—	Ala-Asn	—	Бычий сывороточный альбумин	Глиадины —
Bz-Arg-NH <sub>2</sub>	+	Gly-Val	—	Лизоцим	Глютенины —
Bz- <i>DL</i> -Arg-NPhNO <sub>2</sub>	+	His-Leu	—	Гистоны	—
Bz- <i>DL</i> -Arg-NNft	±	poly(Lys)	—	Казеин	±
Bz-Arg-OEt	+	Z-Gln-Tyr	—	Протамины	+
Bz- <i>DL</i> -Lys-NPhNO <sub>2</sub>	+	Bz-Gly	—	Белки ржи	—
Leu-NNft	—	Bz-Gly-Arg	—	Альбумины	—
Tos-Arg-OMe	+	Bz-Gly-Lys	—	Глобулины	—

\* «+» — расщепляется, «—» — не расщепляется, «±» — слабо расщепляется.

\* Сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC; Bz-*DL*-Arg-NPhNO<sub>2</sub> — нитроанилид N<sup>α</sup>-бензоил-*DL*-аргинина, Bz-*DL*-Arg-NNft — β-нафтиламид N<sup>α</sup>-бензоил-*DL*-аргинина.

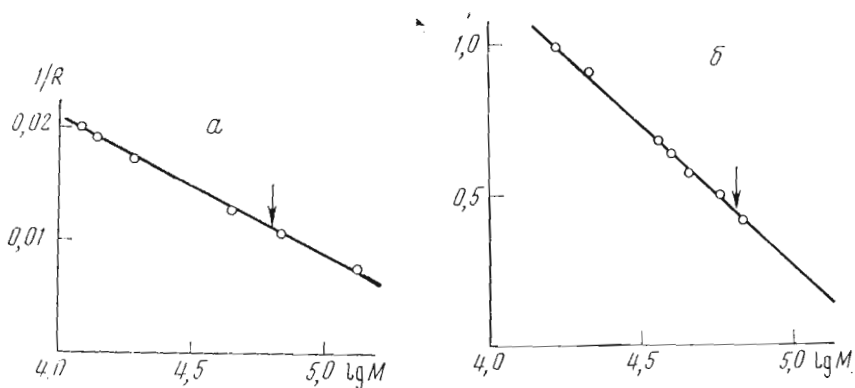


Рис. 3. Графическое определение молекулярного веса БАПАазы: *a* — методом ТСХ на сефадексе G-150 ( $1/R$  — обратная величина относительной подвижности белков); *б* — методом электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-ного додецилсульфата натрия ( $r$  — величина относительной подвижности белков). Стрелкой на обоих графиках указана точка, соответствующая БАПАазе

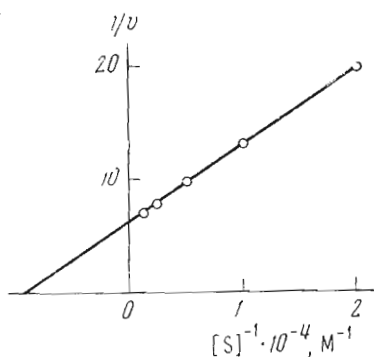


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость относительной скорости расщепления БАПАазой (условные единицы) Tos-Arg-OMe от концентрации субстрата (выраженная по Лайнуиверу и Берку)

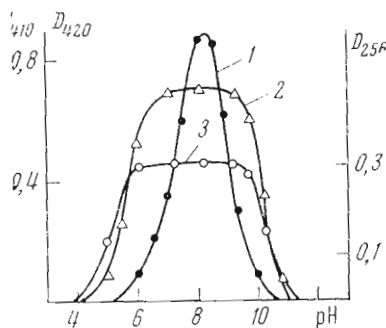


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость активности БАПАазы от pH при расщеплении протаминов (1), Bz-DL-Arg-NHPhNO<sub>2</sub> (2) и Bz-Arg-OEt (3)

роанилидов бензоиларгинина и бензоиллизина, этилового эфира бензоиларгинина и метилового эфира тозиларгинина), а также протаминов. Однако при этом сохранялся слабый гидролиз казеина. Сохранение слабой активности БАПАазы по отношению к казеину, очевидно, говорит о наличии в выделенном препарате фермента небольшой примеси другой протеиназы, не выявляемой методами электрофореза и изоэлектрофокусирования. Предположение, что «казеиназная» активностью обладает сама БАПАаза, не имеет пока достаточного экспериментального обоснования.

Изучение гидролиза синтетических субстратов и белков БАПАазой позволило одновременно выяснить оптимумы pH активности фермента. Оптимум находился при pH 8,2 при гидролизе протамин, а при гидролизе *n*-нитроанилида и этилового эфира бензоиларгинина максимальная активность наблюдалась в интервале pH 6,5—9 (рис. 5).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что БАПАаза семян ржи является трипсиноподобным ферментом, но отличается от трипсина более узкой субстратной специфичностью — отсутствием расщепления многих белков, гидролизуемых трипсином. БАПАазы семян других растений также не расщепляли казеин, гемоглобин, лизо-

цим [2, 3, 8, 10]. Вероятно, БАПАазы — протеиназы с ограниченной субстратной специфичностью, имеющие «свой» специфический субстрат. Ранее было показано [7], что БАПАаза семян гречихи слабо гидролизует гистоны и лучше — протамины. Расщепление протаминов мы наблюдали и в случае БАПАазы из семян ржи. Однако вопрос об истинном субстрате БАПАаз остается открытым, и его решение требует дальнейших исследований.

### Экспериментальная часть

Фермент выделяли из семян ржи (*Secale cereale* L.), сорт Гибридная-2 [9]. Степень расщепления *n*-нитроанилидов бензоил-*DL*-аргинина и бензоил-*DL*-лизина определяли спектрофотометрически при 410 нм, измеряя количество отщепляющегося *n*-нитроанилина [11]; гидролиз  $\beta$ -нафтиламидов  $N^\alpha$ -бензоил-*DL*-аргинина и *L*-лейцина контролировали спектрофотометрически при 335 нм [12], гидролиз  $N^\alpha$ -бензоил-*L*-аргиниламида — при 410 нм, следя за выделением аммиака с помощью реактива Несслера [13]. Эстеразную активность фермента контролировали спектрофотометрически по расщеплению этиловых эфиров ацетилтирозина и бензоиларгинина при 256 нм [14] и по расщеплению метилового эфира тозиларгинина при 247 нм [15]. Протеолитическую активность БАПАазы по расщеплению пептидов и белков определяли методом тринитрофенилирования [16]. Опыты по расщеплению субстратов проводили в 0,01 М Na-фосфатном буфере (рН 7,6) и температуре 37°. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое катализировало гидролиз 1 мкмоль *n*-нитроанилида бензоиларгинина в 1 мин.

Концентрацию белков в растворе определяли спектрофотометрически при 280 нм, а также методом Лоури [17].

Аналитический вариант электрофореза вели в 7,5%-ном полиакриламидном геле с трис-глициновым электродным буфером рН 8,3 [18]. Белок в концентрированном растворе сахарозы наслаивался на поверхность геля под буфер. Время электрофореза 40 мин при напряжении 700 В и силе тока 4—5 мА на трубку. Столбики геля окрашивались в течение 15 мин 1%-ным раствором амидового черного в 7%-ной уксусной кислоте. Избыток красителя отмывался в 7%-ной уксусной кислоте.

Препаративный электрофорез в блоке осуществляли таким же методом, как и аналитический (7,5%-ный гель, трис-глициновый буфер рН 8,3). Время полимеризации геля в блок 2 ч, размеры блока 11,0 × 8,0 × 0,7 см. Электрофорез проводили в течение 4 ч при силе тока 45 мА. Для предотвращения разогрева электродного буфера в него периодически добавляли лед (замороженный электродный буфер). По окончании электрофореза блок геля разрезали на полоски толщиной 1 мм и заливали их 3,0 мл 0,005 М фосфатного буфера рН 7,6. Элюцию фермента из геля вели в течение 20 ч.

Седиментационный анализ проводили в аналитической ультрацентрифуге «Spinco» (модель E) с адсорбционной ультрафиолетовой системой, регистрирующей поглощение при длине волны 230 нм; скорость вращения ротора 56 100 об/мин.

Молекулярный вес БАПАазы определяли методом ТСХ на сефадексе G-150 («сверхтонкий») в 0,01 М фосфатном буфере рН 7,6 [19]. Снятую с помощью ватмана ЗММ реплику окрашивали 0,1%-ным раствором бромфенолового синего в системе метанол — ледяная уксусная кислота (9 : 1). В качестве белков-маркеров были использованы бычий сывороточный альбумин (*M* 68 000 и 136 000), овальбумин (*M* 45 000), ингибитор трипсина из сои (*M* 21 500), РНКаза (*M* 13 680) и цитохром *c* (*M* 12 400).

Определение молекулярного веса с помощью электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-ного додецилсульфата нат-

рия проводили по методу [20]. Гели окрашивали раствором кумасси голубого (0,25%) в системе метанол — лед, уксусная кислота — вода (5 : 1 : 1). В качестве белков-маркеров были использованы бычий сывороточный альбумин (68 000), овальбумин (45 000), лактатдегидрогеназа (36 000), альдолаза (40 000), пируваткиназа (57 000), ингибитор трипсина из сои (21 500) и гемоглобин (17 000).

Изоэлектрическое фокусирование проводили по методу Хаглунда [21] в колонке типа ЛКВ-8100 объемом 110 мл при 4° (с помощью раствора амфолинов создавался градиент рН от 4 до 6), а также в полиакриламидном геле по методу Ригли [22]. Полимеризация геля (4,25%) осуществлялась в стеклянных трубочках 0,5×6,5 см в течение 30 мин. Гель содержал амфолины (концентрация 0,75%) и препарат фермента с общим содержанием белка 150 мкг на трубочку. С помощью амфолинов создавался градиент рН 4—6. После фокусирования столбики геля окрашивали раствором кумасси голубого в течение 15 мин при нагревании на водяной бане (60°) по методу, описанному Вестербергом [23].

Константу Михаэлиса ( $K_m$ ) БАПАазы для метилового эфира тозил-*L*-аргинина и этилового эфира бензоил-*L*-аргинина определяли по Лайнуиверу и Барку [24] в 0,01 М Na-фосфатном буфере (рН 7,6) при температуре 37°.

Фракционирование белков из семян ржи проводили по методу Осборна [25] с последовательной экстракцией из муки альбуминов и глобулинов (5%-ный раствор NaCl), глиадинов (70%-ный этанол) и глютеинов (0,1 М раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Альбумины и глобулины разделяли затем при диализе против дистиллированной воды. Полученные этим методом белковые фракции лиофилизировали и использовали для изучения субстратной специфичности БАПАазы.

Растворы белков концентрировали на приборе фирмы «Amicon» (США) на мембранах ХМ-50.

Выражаем искреннюю благодарность проф. Шпикитеру В. О. за постоянное внимание и интерес к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Burger W. C. (1966) Cereal Sci. Today, **11**, 19—32.
2. Kruger J. E. (1971) Cereal Chem., **48**, 512—522.
3. Graf G., Hoagland R. E. (1969) Phytochemistry, **8**, 827—830.
4. Beevers L. (1968) Phytochemistry, **7**, 1837—1844.
5. Pusztai A., Duncan J. (1971) Planta, **96**, 317—325.
6. Cameron E. C., Mazelis M. (1971) Plant physiol., **48**, 278—281.
7. Белозерский М. А., Емцева И. Б., Курсанова Т. А. (1973) Докл. АН СССР, **209**, 1215—1218.
8. Земчик Е. И., Шутов А. Д., Вайнтрауб И. А. (1973) Биохимия, **38**, 964—970.
9. Дунаевский Я. Е., Белозерский М. А. (1974) Вестн. Моск. ун-та, **1**, 81—84.
10. Burger W. C., Prentice N., Kastenschmidt J., Moeller M. (1968) Phytochemistry, **7**, 1261—1270.
11. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) Arch. Biochem. and Biophys., **95**, 271—278.
12. Lee H. J., La Rue J. N., Wilson J. B. (1971) Anal. Biochem., **41**, 397—401.
13. Mycek M. J. (1970) Methods in Enzymol., **19**, 285—315.
14. Walsh K. A., Wilcox P. E. (1970) Methods in Enzymol., **19**, 31—41.
15. Walsh K. A. (1970) Methods in Enzymol., **19**, 41—63.
16. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Shinoda T. (1960) J. Biochem., **47**, 654—666.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265—275.
18. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404—427.
19. Stransky L., Srch M. (1967) J. Chromatogr., **28**, 146—147.
20. Heber K., Pringle J. R., Osborne M. (1972) Methods in Enzymol., **26**, 3—27.
21. Haglund H. (1967) Science Tools, **14**, 17—23.
22. Wrigley C. (1968) Science Tools, **15**, 17—23.
23. Vesterberg O. (1972) Biochim. et. biophys. acta, **257**, 11—19.
24. Lineweaver H., Burk D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658—666.
25. Осборн Т. В. (1935) Растительные белки, Биомедгиз, М.—Л.

Поступила в редакцию  
25.VII.1975

## TRYPSIN-LIKE ENZYME FROM RYE SEEDS: SOME PROPERTIES AND SUBSTRATE SPECIFICITY

DUNAEVSKY Ya. E., KOMANTSEV V. N., BELOZERSKY M. A.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov  
State University, Moscow*

A proteolytic enzyme (BAPAase), hydrolyzing N-benzoyl-*DL*-arginine *p*-nitroanilide (BAPA), has been isolated from rye seeds. The enzyme has been purified 280-fold and was homogeneous according to polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing and sedimentation. The molecular weight of the enzyme was estimated as  $\sim 64\,000$ ,  $S_{20,w} = 4.4$  S, isoelectric point — 4.5. The enzyme was completely inhibited by diisopropylphosphoridate and N-tosyl-*L*-lysine chloromethyl ketone, and was not inhibited by N-tosyl-*L*-phenylalanine chloromethyl ketone. With synthetic substrates BAPAase was found to hydrolyze peptide, ester and amide bonds formed by lysine and arginine carboxyl groups. The enzyme noticeably hydrolyzed protamines and weakly-casein. According to the data obtained BAPAase from rye seed is classified as a trypsin-like enzyme.

---