



УДК 577.156.2

**КОЛЛАГЕНАЗОПОДОБНЫЙ ФЕРМЕНТ АДЕНОГИПОФИЗА:
ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ЕГО СВОЙСТВА***Алексеевко Л. П., Золотов Н. Н., Орехович В. Н.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Разработан метод выделения коллагеназоподобного фермента из аденогипофиза. Метод, позволяющий очистить фермент в 470 раз, включает фракционирование экстракта на DEAE-сефадексе, ковалентную хроматографию на колонке с ртутьорганической сефарозой, гель-фильтрацию на сефадексе G-75 и хроматографию на DEAE-целлюлозе. pH-Оптимум активности коллагеназоподобного фермента лежит при pH 8,0—8,25. Фермент обратимо инактивируется 4-аминофенилмеркурийацетатом и мертиолом. Дитиотреит, 2-меркаптоэтанол и цистеин восстанавливают активность коллагеназоподобного фермента; динитрофторфосфат, подоуксусная кислота и N-тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон частично угнетают его активность. EDTA и N-тозил-L-лизилхлорметилкетон на активность коллагеназоподобного фермента не действуют.

Начиная с 1963 г. нами ведутся поиски новых узкоспецифичных протеиназ, в результате действия которых происходит образование биологически активных белков и пептидов путем ограниченного протеолиза высокомолекулярных предшественников. В 1972 г. в нашей лаборатории в гипофизе и гипоталамусе крупного рогатого скота была обнаружена активность фермента, расщепляющего синтетический субстрат клостридиопептидазы A: Cbz-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-OMe [1, 2].

Фермент гидролизует связь между остатками аланина и глицина, находящимися в соседстве с остатками пролина, но не расщепляет коллаген. Он был назван коллагеназоподобным ферментом. Задачей данного исследования явилось изучение свойств и разработка метода выделения коллагеназоподобного фермента.

Поскольку коллагеназоподобный фермент еще мало изучен, прежде всего было необходимо познакомиться со свойствами этого фермента в экстракте и частично очищенных препаратах.

Коллагеназоподобный фермент является тиоловым ферментом. Дитиотреит ($1 \cdot 10^{-3}$ M), 2-меркаптоэтанол ($1 \cdot 10^{-2}$ M), цистеин ($5 \cdot 10^{-3}$ M) увеличивают активность фермента в 6—7 раз. Тиогликолевая кислота ($5 \cdot 10^{-3}$ M) активизирует фермент значительно слабее, увеличивая его активность примерно на 60%. β -Тиодигликоль ($5 \cdot 10^{-3}$ M) влияния на активность фермента не оказывает.

Было исследовано действие ряда ингибиторов на коллагеназоподобный фермент (табл. 1). Мертиолат полностью угнетает активность фермента. Это торможение активности обратимо, активность восстанавливается при добавлении 2-меркаптоэтанола или цистеина.

pH-Оптимум активности коллагеназоподобного фермента лежит в щелочной зоне pH 8,0—8,25 (рис. 1). Активность фермента не зависит от ионной силы буфера.

Препараты, очищенные от протеиназ широкого спектра действия, устойчивы при хранении в 0,02 М медиал-ацетатном буфере, pH 7,4, при температуре 8° по крайней мере в течение трех месяцев.

На основании вышеприведенных данных был разработан метод выделения коллагеназоподобного фермента. Мы отказались от традиционного фракционирования белков экстракта аденогипофиза сульфатом аммония, поскольку при выделении этого фермента оно оказалось малоэффективным. Водный экстракт, разбавленный слабощелочным буфером, пропускали через колонку DEAE-сефадекса А-50. pH и ионная сила были подобраны так, что коллагеназоподобный фермент полностью адсорбировался на ионообменнике. Это позволило уже на первом этапе полностью избавиться от протеиназы I [4], обладающей в кислой среде широким спектром действия. Протеиназа I в данных условиях не адсорбируется на DEAE-сефадексе А-50. Коллагеназоподобный фермент десорбируется с колонки главным образом 0,10 М NaCl. Удельная активность изучаемого фермента в элюате была 62 мЕ/мг. Для более полного выхода фермента колонку промывали 0,3 М NaCl. Удельная активность коллагеназоподобного фермента в 0,3 М элюате была 17—20 мЕ/мг. Активность на первой стадии очистки по сравнению с экстрактом увеличивается в 10 раз в первом элюате и в 4 раза во втором. В табл. 2 мы приводим усредненные данные.

Поскольку коллагеназоподобный фермент оказался SH-зависимым, мы смогли применить для его дальнейшей очистки специфический адсорбент — ртутьорганическую сефарозу (сефаронил-4-аминофенилмеркурийацетат), использовавшуюся ранее Баррэттом [5] и Отто и др. [6] для выделения катепсина В-1. Второй этап очистки дает нам 30-кратное увеличение активности коллагеназоподобного фермента. Такой сравнительно обогащенный

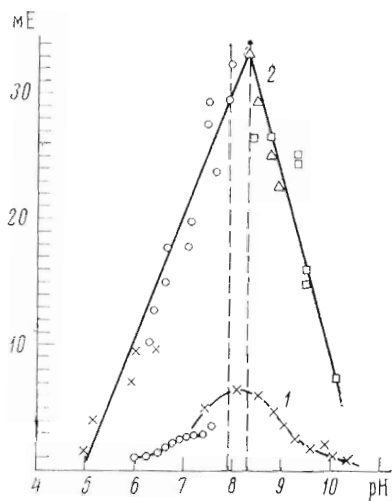


Рис. 1. Зависимость активности коллагеназоподобного фермента от pH: а — в экстракте, б — в частично очищенном препарате

Таблица 1
Действие ингибиторов на активность коллагеназоподобного фермента

Ингибиторы	Концентрация ингибиторов в пробе, М	Аминокислотные остатки, подвергающиеся действию ингибитора [3]	Остаточная активность фермента, %
Мертиолат	$2,7 \cdot 10^{-3}$	Cys	0
Иодуксусная кислота	$1,0 \cdot 10^{-3}$	Cys, His, Lys	30
Динизопропилфторфосфат	$1,0 \cdot 10^{-3}$	Ser	25
TosPheCH ₂ Cl	$1,7 \cdot 10^{-4}$	His	40
TosLysCH ₂ Cl	$3,0 \cdot 10^{-4}$	His	100
Мертиолат + цистеин	$2,7 \cdot 10^{-3}$	—	100
Мертиолат + 2-меркаптоэтанол	$2,7 \cdot 10^{-3}$	—	100
Иодуксусная кислота + 2-меркаптоэтанол	$1,0 \cdot 10^{-3}$	—	97
EDTA-Na ₂	$1,0 \cdot 10^{-3}$	—	100
EDTA-Na ₂	$1,0 \cdot 10^{-2}$	—	75

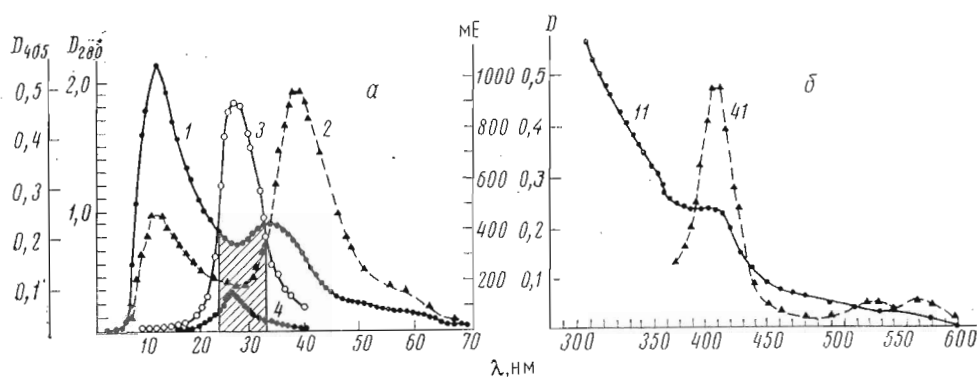


Рис. 2. *а* — гель-фильтрация коллагеназоподобного фермента на сефадексе G-75: 1 — кривая поглощения при 280 нм, 2 — при 405 нм, 3 — удельная активность коллагеназоподобного фермента, 4 — удельная активность пролилкарбоксипептидазы II. Собранные для дальнейшей очистки фракции обозначены штриховкой. *б* — поглощение света в видимой части спектра высокомолекулярными и низкомолекулярными белками, отделяющимися от коллагеназоподобного в процессе гель-фильтрации. 11 — поглощение света фракцией 11; 41 — поглощение света фракцией 41 (фракции собраны при гель-фильтрации на сефадексе G-75)

ферментом препарат подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-75. Этот этап очистки позволял увеличить удельную активность фермента в 110 раз. Гель-фильтрация в данном случае позволяет освободиться как от высокомолекулярных, так и от низкомолекулярных окрашенных белковых примесей (рис. 2, *а*). Низкомолекулярные примеси, по-видимому, являются гемопротейдами, поскольку дают максимум поглощения света при 405 нм (рис. 2, *б*); высокомолекулярные примеси четкого максимума поглощения в области линий Соре не дают. Гемопротейды в основной своей массе отделяются еще на первой стадии выделения коллагеназоподобного фермента, так как они практически не сорбируются на DEAE-сефадексе в данных условиях. Но небольшая фракция их все-таки адсорбируется и элюируется NaCl вместе с коллагеназоподобным ферментом, далее, поскольку гемопротейды содержат тиоловые группы, они адсорбируются ртутьорганической сефарозой. Гель-фильтрация на сефадексе G-75 позволяет освободиться от остаточных гемопротейдов. Получаемый на этой стадии препарат коллагеназоподобного фермента содержит еще примесь пролилкарбоксипептидазы II [7]. Следующая стадия очистки — хроматография на DEAE-целлюлозе позволяет повысить активность коллагеназоподобного фермента в 470—500 раз. Фермент десорбируется с DEAE-целлюлозы при концентрации 0,40—0,42 M NaCl (рис. 3). При этом образуется два пика активности. Наиболее высокая активность изучаемого фермента обнаруживается во фракциях, где концентрация белка столь

Таблица 2

Выделение коллагеназоподобного фермента из аденогипофиза крупного рогатого скота

Этапы очистки	Общее содержание белка, мг	Удельная активность, МЕ/мг	Общая активность, МЕ	Очистка	Выход, %
Водный экстракт	19 650	5,69	111 500	—	100
DEAE-сефадекс	2 960	31,2	91 900	5,5	80
Ртутьорганическая сефароза	187	162,5	30 300	28,5	28
Сефадекс G-75	30,4	630,0	19 200	111,0	18
DEAE-целлюлоза	1,2	2670,0	3 210	470,0	2,8

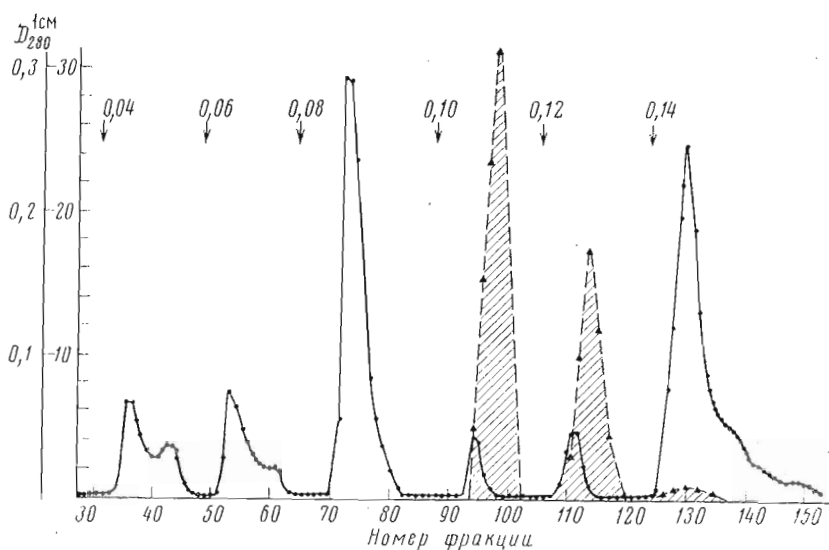


Рис. 3. Хроматография коллагеназоподобного фермента на DEAE-целлюлозе DE-32 («Whatman»). Смена элюирующего раствора NaCl показана стрелками. Фракции фермента, собранные в два препарата, обозначены штриховкой

мала, что его практически не удастся обнаружить существующими методами. Активные фракции, собранные в два препарата и сконцентрированные в 15 раз ультрафильтрацией, при электрофорезе в полиакриламидном геле дают по две диффузные полосы. Высокоочищенные препараты коллагеназоподобного фермента не выдерживают хранения в замороженном состоянии. При хранении при -20° в течение двух месяцев активность снижается на 93%.

В органах, богатых соединительной тканью [8—10], экспериментальных грануломах [11, 12], в культуре ткани хвоста головастика [13, 14], в культуре клеток HeLa [15] во внутренних органах [16—19], в сыворотке крови [20, 21], митохондриях клеток печени [22, 23], в опухоли [24], яйчиках [25], яйцах, сперматозоидах [26, 27] обнаружены ферменты, действующие на пентапептид $\text{Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg}^*$ и, как и коллагеназоподобный фермент, не гидролизующие коллаген. Эти ферменты, представляющие по своим свойствам очень разнородную группу, объединены под общим названием Pz-пептидаз. Оптимум pH-активности этих ферментов лежит в интервале 6,8—8,8. Среди них есть ферменты, активируемые ионами двухвалентных металлов [10] и тиоловыми соединениями [12, 18, 19], а также ферменты, угнетаемые диизопропилфторфосфатом [20]. Некоторые из них частично очищены [19, 23], но оптимальные условия их выделения еще не подобраны, и выход фермента очень мал.

Роль коллагеназоподобного фермента в гипофизе пока еще неясна. Pz-пептидаза из почек, по-видимому, принимает участие в расщеплении коллагена в комплексе с коллагеназой [19]. Не действуя непосредственно на нативный коллаген, Pz-пептидазы расщепляют фрагменты коллагена ТС_A и ТС_B , полученные после действия коллагеназы животного происхождения. Присутствие такого фермента в почках вполне понятно, поскольку было показано, что в клубочках почек происходит довольно интенсивный синтез и выделение коллагена [28]. Однако трудно себе представить, чтобы в таких органах, как гипофиз и гипоталамус, функция столь активного фермента была направлена на расщепление коллагена. По нашим данным,

* Pz — 4-phenylazo-benzylloxycarbonyl-.

удельная активность коллагеназоподобного фермента в аденогипофизе варьирует от 5,0 до 18 мЕ/мг. Самая высокая активность Рз-лептитаз в других органах млекопитающих — в почках, печени, сердечной мышце — не превышает 3 мЕ/мг [18].

Возможно, что действие коллагеназоподобного фермента в гипофизе направлено на расщепление белковых гормонов. В первичной структуре этих соединений [29—36], а также лейрофизинов [37—39] имеются участки последовательности, напоминающие структуры коллагена -Pro-X-Y-Pro-. Не исключено, что подобные участки будут расщепляться коллагеназоподобным ферментом. Гипоталамические факторы — люлиберин и тиролиберин (так называются факторы, освобождающие лютеинизирующий и тиреотропный гормоны, по новой классификации [40]) имеют С-концевую последовательность -Arg-Pro-Gly-NH₂ [41], -Glu-His-Pro-NH₂ [42] соответственно. Поскольку есть данные, что гипоталамические факторы образуются путем нематричного синтеза [43], можно предположить, что они образовались путем гидролиза коллагеназоподобным ферментом участков -Pro-X-Y-Pro- в молекулах предшественников этих факторов с последующим удалением одного С-концевого аминокислотного остатка под действием пролилкарбоксипептидазы [7] в случае тиролиберина и амидирования обоих пептидов. В настоящее время изучение специфичности выделенного нами фермента еще только начинается и изложенные здесь рассуждения — пока только рабочая гипотеза.

Экспериментальная часть

Источник фермента. Аденогипофизы крупного рогатого скота получали в замороженном состоянии на мясокомбинате и хранили при -20°.

Субстрат. Гексапептид Cbz-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-OMe получен у В. А. Шибнева в Институте молекулярной биологии [44]. Препарат хроматографически гомогенен, не дает реакции с нингидрином, $[\alpha]_D^{25} = +93^\circ$.

Определение активности коллагеназоподобного фермента. Инкубационная смесь: к 0,05 мл раствора фермента в 0,02 М трис-НCl-буфере, pH 7,5, добавляли 0,05 мл 0,3 М боратного буфера (0,3 М H₃BO₃ — NaOH — KCl), pH 8,15, содержащего 10⁻² М 2-меркаптоэтанол и 0,05 мл водного раствора субстрата (3·10⁻² М). Пробы инкубировали при 38°. По истечении времени инкубации образующиеся продукты реакции количественно определяли методом хроматографии на бумаге в системе растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 1 : 3 по объему, 20 ч. Разделившиеся на хроматограмме вещества проявляли нингидрином, экстрагировали в виде медных комплексов по Бодэ [45] и их количество определяли спектрофотометрически при 510 мμ. Для определения активности очищенного препарата концентрация белка в пробах была 20—50 мг/мл. При определении активности фермента в экстракте и частично очищенных препаратах концентрация белка составляла 0,1—1,0 мг/мл. Время инкубации при работе с очищенным препаратом 15 мин, при работе с экстрактом и частично очищенными препаратами — 2 ч.

За единицу активности коллагеназоподобного фермента принимали количество фермента, освобождающее 1 мкмоль трипептида Gly-Pro-Gly-OMe в приведенных выше условиях. Удельную активность выражали числом мЕ на 1 мг белка ферментного препарата.

Определение содержания белка в пробах проводили по поглощению УФ-света при 280 и 260 мμ, рассчитывая его концентрацию по формуле $c, \text{ мг/мл} = 1,45 D_{280} - 0,74 D_{260}$ [46], а также по методу Лоури [47].

Предварительная очистка коллагеназоподобного фермента. Экстракт аденогипофиза, осветленный центрифугированием при 36 000 *g*, высаливали сульфатом аммония при 80% насыщения. Осадок смешивали с сефадексом G-25, промытым раствором сульфата аммония при 80% насыщения. Полученную пасту последовательно промывали растворами понижающих

ся концентраций сульфата аммония от 75 до 25% насыщения, постепенно растворяя осадок белка. Активность фермента обнаруживалась главным образом во фракциях, растворимых при 55 и 45% насыщения. Растворы с изучаемым ферментом концентрировали высаливанием сульфатом аммония при 80% насыщения и подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-75 (колонки $3,5 \times 150$ см в медиал-ацетатном буфере (pH 7,4), 0,02 М). Полученные активные фракции использовали для изучения свойств коллагеназоподобного фермента и подбора оптимальных условий его выделения.

Определение активности протеиназы I. К 0,5 мл 1%-ного раствора гемоглобина в 0,1 М цитратном буфере, pH 2,4, добавляли 0,5 мл препарата фермента в 0,02 М трис-HCl-буфере (или 0,02 М медиал-ацетатном буфере), pH 7,5. Инкубационная смесь приобретала pH 3,5. Пробу инкубировали 1 ч и белки осаждали 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования проб измеряли оптическую плотность при 280 нм. Величину активности выражали в единицах прироста оптической плотности, вызываемого 1 мг белка за 60 мин ($D_{280}^{1\text{ см}} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot 60 \text{ мин}^{-1}$). Концентрация белка в пробах подбиралась так, чтобы прирост оптической плотности не превышал 0,2, поскольку линейная зависимость между приростом величины оптической плотности и концентрацией белка лежит только в интервале 0,05—0,2 оптической плотности [4].

Определение pH-оптимума активности проводили в следующих буферных смесях: pH 4,5—6,4 — в 0,1 М цитратной; 5,9—7,8 — в 0,1 М К, Na-фосфатной; 8,2—8,7 — в 0,01 М медиал-ацетатной, содержащей 0,07 М NaCl; 7,4—10 — в 0,1 М боратной; 8,3—9,7 — в 0,01 М глициновых буферных смесях. Ко всем буферным смесям добавлялся 2-меркаптоэтанол до концентрации 10^{-2} М.

Изучение действия ингибиторов и активаторов. В качестве ингибиторов были использованы диизопропилфторфосфат 10^{-3} М, мертиолат (этилмеркурийтиосалицилат натрия) $2,7 \cdot 10^{-3}$ М, иодуксусная кислота 10^{-3} М, N-тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон (TosPheCH₂Cl) и N-тозил-L-лизилхлорметилкетон (TosLysCH₂Cl) 10^{-1} М. Преинкубация фермента проводилась с мертиолатом в течение 15 мин, с диизопропилфторфосфатом и иодуксусной кислотой — 30 мин и с хлорметилкетонами — 2 ч. При поиске активаторов коллагеназоподобного фермента было исследовано действие 2-меркаптоэтанолла, цистеина, тиогликолевой кислоты, β-тиодигликоля в концентрации 10^{-3} — 10^{-2} М и дитиотрепта 10^{-4} — 10^{-3} М.

Первый этап очистки — выделение фермента. 350 г гомогената аденинофизов экстрагировали двумя объемами воды в течение 2 ч. Экстракцию и все последующее выделение фермента проводили при 4°. Экстракт отделяли от остатков ткани скоростным центрифугированием на ЦВР-1 при 15 000 об/мин. Полученный осветленный экстракт разбавляли в 2 раза 0,04 М трис-HCl-буфером, pH 7,5, и наносили на колонку (4×50 см) DEAE-сефадекса A-50, предварительно уравновешенную тем же буфером. После пропускания экстракта колонку отмывали тем же буфером от неадсорбировавшихся белков. Элюцию проводили растворами 0,1 и 0,3 М NaCl в том же буфере.

Второй этап очистки — специфическое связывание SH-зависимых ферментов ртутьорганическим адсорбентом, который был синтезирован нами по методу Баррэтта [5]. 4-Аминофенилмеркурияцетат, необходимый для этого синтеза, был получен по методу Госвани [47]. Колонка ($2,5 \times 40$ см), содержащая ртутьорганическую сефарозу, переводилась в меркаптидную форму путем ее обработки раствором 0,01 М цистеина в 0,02 М трис-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 0,2 М NaCl. В белковом растворе, полученном после элюции с DEAE-сефадекса, концентрацию NaCl доводили до 0,2 М и раствор наносили на колонку, которую затем отмывали от балластных белков, не реагирующих с сефарозой, а SH-зависимые ферменты элюировали раствором 0,01 М цистеина в том же буфере. Рего-

нерацию колонки проводили путем пропускания через нее двух объемов 0,01 М раствора уксуснокислой ртути.

Третий этап очистки — гель-фильтрация на колонке сефадекса G-75. Элюат, полученный на предыдущем этапе выделения, концентрировали ультрафильтрацией на фильтре «Amicon PM-10» до 15 мл (187 мг белка, 163 мЕ/мг) и наносили на колонку (3,5 × 150 см) сефадекса G-75, уравновешенную 0,02 М трис-HCl-буфером, содержащим 10^{-5} М дитиотреит. Колонку элюировали тем же буфером со скоростью 15 мл/ч, фракции собирали по 3,5 мл.

Четвертый этап очистки — хроматография на DEAE-целлюлозе DE-32 («Whatman»). Полученные при гель-фильтрации фракции, содержащие активность коллагеназоподобного фермента, объединяли (39 мл, 30 мг белка, 6300 мЕ/мг) и наносили на колонку DEAE-целлюлозы (1,5 × 10 см), уравновешенную 0,02 М трис-HCl-буфером, pH 7,5, с добавленным к нему до концентрации 10^{-5} М дитиотреитом. Белки элюировали ступенчатым повышением концентрации NaCl от 0,04 до 0,014 М в том же буфере. Активные фракции собирали и концентрировали ультрафильтрацией.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [48] в 7,5%-ном геле при pH 8,9.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левдикова Г. А., Орехович В. Н. (1973) В сб. Вопросы биохимии мозга, 8, 127—129, Изд-во АН АрмССР.
2. Levdikova G. A., Orekhovich V. N. (1972) Clin. chim. acta, 42, 205—208.
3. Kuhn R. W., Walsh K. A., Neurath H. (1974) Biochemistry, 13, 3871—3877.
4. Ellis S. (1960) J. Biol. Chem., 235, 1694—1699.
5. Barrett A. J. (1973) Biochem. J., 131, 809—822.
6. Otto K., Riesenkonig H. (1975) Biochim. et biophys. acta, 379, 462—475.
7. Алексееко Л. П., Золотов Н. Н., Балаевская Т. О., Орехович В. Н. (1975) Биорган. химия, 1, 853—854.
8. Strauch L., Vencelj H., Hannig K. (1968) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 349, 171—178.
9. Gries G., Grasedyck K. (1969) Verh. Dtsch. Gesel. Pathol., 53, 205—209.
10. Rabadjija L., Koren E., Rende B. (1970) Biochim. et biophys. acta, 230, 620—626.
11. Stancikova M., Trnavsky K. (1974) Experientia, 30, 594—595.
12. Aswanikumar S., Radhakrishnan A. N. (1972) Biochim. et biophys. acta, 276, 241—249.
13. Harper E., Gross J. (1970) Biochim. et biophys. acta, 198, 286—292.
14. Harper E. (1970) in Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix (Balazs E. A., ed.), 3, 1653—1663, Acad. Press.
15. Strauch L., Vencelj H. (1967) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 348, 465—468.
16. Platt D. (1969) Z. ges. exp. Med., 150, 185—193.
17. Cutroneo K. R., Fuller G. C. (1970) Biochim. et biophys. acta, 198, 271—275.
18. Aswanikumar S., Radhakrishnan A. N. (1973) Biochim. et biophys. acta, 304, 210—216.
19. Aswanikumar S., Radhakrishnan A. N. (1975) Biochim. et biophys. acta, 384, 194—202.
20. Bannister D. W., Burns A. B. (1972) Int. J. Biochem., 3, 216—224.
21. Gries G., Buresch H., Strauch L. (1970) Experientia, 26, 31—33.
22. Heidrich H. G., Prokopova D., Hannig K. (1969) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 350, 1430—1436.
23. Heidrich H. G., Kronschnabl O., Hannig K. (1973) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 354, 1399—1404.
24. Keiditsch E., Strauch L. (1970) in Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix (Balazs E. A., ed.), 3, 1671—1675.
25. Espey L. L., Rondell P. (1967) J. Appl. Physiol., 23, 757—761.
26. Koren E., Lukač S., Milkovic S. (1974) J. Reprod. and Fert., 36, 161—167.
27. Koren E., Milkovic S. (1973) J. Reprod. and Fert., 32, 349—356.
28. Cohen M. P., Vogt C. A. (1975) Biochim. et biophys. acta, 393, 78—87.
29. Юдаев Н. А., Панков Ю. А., Елизарова Г. П., Хан З., Николаева О. П. (1975) Биорган. химия, 1, 97—112.
30. Li Ch. H., Dixon J. S., Tung Bin Lo, Pankov Yu. A., Schmidt K. D. (1969) Nature, 224, 695—696.
31. Li Ch. H., Dixon J. S. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 146, 233—236.

32. Zakin M. M., Poskus E., Dellacha J. M., Paladini A. C. (1973) FEBS Lett., 34, 353—355.
33. Basudev Shome, Parlow A. F. (1973) J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 36, 618—629.
34. Ta Hsiu Liao, Pierce J. G. (1971) J. Biol. Chem., 246, 850—865.
35. Sairam M. R., Li Ch. H. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 54, 426—431.
36. Sairam M. R., Parkoff H., Li Ch. H. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 48, 530—541.
37. Wu T. C., Croom S., Saffran M. (1971) J. Biol. Chem., 246, 6043—6063.
38. Walter R., Schlesinger D. H., Schwartz I. L. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 44, 293—298.
39. Schlesinger D. H., Capra J. D., Walter R. (1974) Int. J. Pep. Protein Res., 6, 1—12.
40. The nomenclature of peptide hormone (1975) Biochim. et biophys. acta, 404, 152—155.
41. Johansson K. N. A., Currie B. L., Folkers K., Bowers C. Y. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 50, 8—13.
42. Parkoff H. (1973) Endocrinology, pp. 596—600, Amsterdam — New York.
43. Reichlin S., Mitnick M. A. (1973) Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 142, 497—501.
44. Шибнев В. А. (1972) Докт. дис. «Синтез регулярных полипептидов и применение их для изучения структуры коллагена», М.
45. Bode F. (1955) Biochem. Z., 326, 433—435.
46. Kalckar H. M. (1974) J. Biol. Chem., 167, 461—475.
47. Goswami M., Das Gupta H. N. (1931) J. Indian Chem. Soc., 8, 475—479.
48. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—414.

Поступила в редакцию
14.I.1976

COLLAGENASE-LIKE ENZYME FROM ADENOHYPOPHYSIS: PURIFICATION AND SOME PROPERTIES

ALEXEENKO L. P., ZOLOTOV N. N., OREKHOVICH V. N.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

A method for isolation of collagenase-like enzyme from adenohypophysis providing a 470-fold purification has been developed. It involves fractionation on DEAE-Sephadex A-50, covalent chromatography on organomercurial-sepharose column, gel filtration on Sephadex G-75 and DEAE-cellulose chromatography. The enzyme showed an optimum pH of 8.0—8.25. It was reversibly inactivated with 4-aminophenylmercuriacetate and merthiolate. Dithiothreitol, 2-mercaptoethanol and cysteine restored the activity of the enzyme. Diisopropylphosphofluoridate, iodoacetic acid and TPCK inhibited its activity by 75, 70 and 60% respectively, whereas EDTA and TLCK proved to be without effect.