



УДК 577.152.34'14:543.51

ГРИБНАЯ АСПАРТАТНАЯ ПРОТЕИНАЗА ИЗ *Trichoderma viride*. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ ОЛИГОПЕПТИДОВ

© 1998 г. А. Н. Симанкова, О. А. Миргородская[#], Н. В. Савельева, А. Н. Савельев*, Р. Кёрнер**, П. Ройпсторфф**, С. Л. Александров***

Институт цитологии РАН, 198103, С.-Петербург, Тихорецкий просп., 4;

*Государственный технический университет, С.-Петербург;

**Университет, Оденсе, Дания;

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

Поступила в редакцию 16.10.97 г. Принята к печати 02.03.98 г.

Выделена, очищена и охарактеризована грибная аспартазная протеиназа из *Trichoderma viride*. Определена рН-зависимость ее функционирования, и показаны характерные черты ее специфичности при ограниченном протеолизе инсулина и мелиттина по сравнению со специфичностью пепсина А и гастриксина. Масс-спектрометрически исследованы особенности кинетики расщепления мелиттина этими ферментами.

Ключевые слова: грибные аспартазные протеиназы; пепсин А; гастриксин; мелиттин; инсулин; протеолиз; кинетика; специфичность; масс-спектрометрия.

Несмотря на возрастающий интерес к изучению функционирования аспартазных протеиназ, систематические исследования специфичности этих ферментов не проводились. Исключение составляет пепсин А, для которого имеются данные по специфичности гидролиза амидных связей в коротких пептидах (см., например, [1, 2]). В отношении же олигопептидов имеются только сведения о специфичности (главным образом для пепсина А), полученные при структурном исследовании ряда белков. Однако именно олигопептиды и белки являются, как правило, природными субстратами аспартазных протеиназ (например, ангиотензиноген [3]).

Специфичность грибных аспартазных протеиназ изучена еще меньше. В то же время связь между характером ограниченного протеолиза этими ферментами карбогидраз и степенью гликозилирования последних свидетельствует о том, что эти гликопротеины являются белковыми субстратами грибных аспартазных протеиназ *in vivo* [4]. Поэтому детальное изучение функционирования такого рода протеиназ при гидролизе олигопептидов и белков крайне актуально. Кроме того, данные по их сравнительной специфичнос-

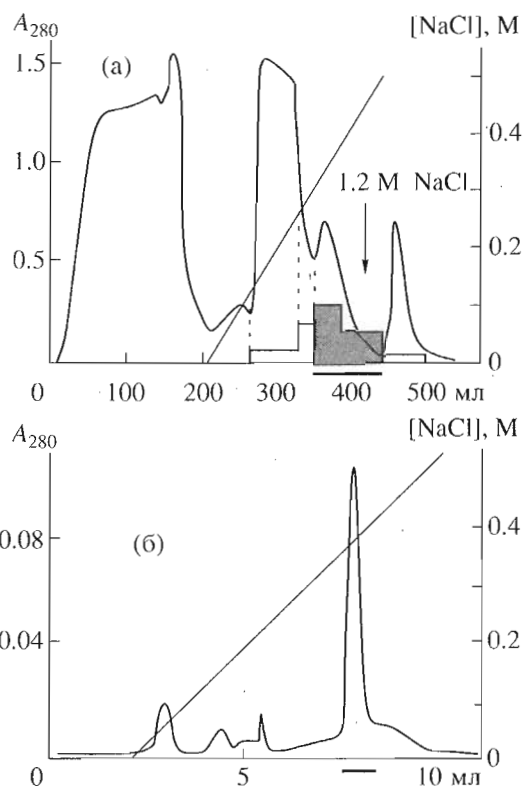


Рис. 1. Хроматограмма обессоленного препарата "Целловиридина" на Q-сефарозе с гистограммой распределения протеолитической активности (а) и ВЭЖХ фракций с максимальной активностью протеиназы *Tv* (отмеченных толстой линией на хроматограмме с Q-сефарозой) на колонке с сорбентом Mono Q (б).

Сокращения: ESI-MS – масс-спектрометрический метод с электродинамическим способом ионизации; MALDI-MS – масс-спектрометрия с матрицей, связанной лазерной десорбцией.

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 247-37-95; факс: (812) 247-03-41; e-mail: oam@om1533.spb.ru).

Таблица 1. Выделение и очистка аспартастной протеиназы *Tv*

Стадия	Белок, ОЕ ₂₈₀	Активность, ед. акт.*	Удельная активность, ед. акт./ОЕ ₂₈₀	Выход, %	Степень очистки
Исходный препарат	2820	400	0.14	100	1
Хроматография на сефадексе G-50	2100	320	0.15	81	1.1
Q-сефарозе	76	210	2.80	53	20
Моно Q	25	140	5.60	35	40

* Понятие и определение единицы активности протеиназ см. в "Эксперимент. части".

Таблица 2. Масс-спектрометрическая идентификация восстановленных дитиотреитом продуктов гидролиза нативного инсулина свиньи пепсином А и аспартастной протеиназой *Tv*

Номер п. п.	Масс-спектрометрические данные, m/z^*	Молекулярная масса, Да		Продукты**
		измеренная	расчетная	
1	726.3	725.3	724.4	B ²⁵⁻³⁰
2	880.4	879.4	879.4	B ¹⁷⁻²⁴
3	917.4	916.4	916.4	B ^{1-8^a}
4	1043.5	1042.5	1042.5	B ¹⁶⁻²⁴
5	1190.6	1189.6	1189.6	B ^{16-25^b}
6	1750.8	1749.8	1748.8	B ^{16-30^b}
7	1027.5	1026.5	1026.5	B ^{17-25^b}
8	1588.3	1587.3	1585.8	B ^{17-30^b}
9	1156.6	1155.6	1155.6	B ¹⁵⁻²⁴
10	1482.6	1481.6	1481.7	B ¹⁻¹³
11	1553.6	1552.6	1551.7	B ¹⁻¹⁴
12	1666.7	1665.7	1664.8	B ^{1-15^b}
13	1303.6	1302.6	1302.6	B ¹⁵⁻²⁵
14	1864.7	1863.7	1864.2	B ^{15-30^b}
15	1935.0	1934.7	1935.3	B ^{14-30^b}
16	1759.8	1758.8	1758.8	A ¹⁻¹⁶
17	1829.7	1828.7	1827.9	B ¹⁻¹⁶
18	2839.8	2838.8	2839.3	B ¹⁻²⁵
19	2383.6	2382.6	2382.0	A-цель
20	2691.3	2690.3	2689.3	B ¹⁻²⁴
21	3400.3	3399.3	3400.0	B-цель

* Для продуктов 1-13, 16, 17, 19 и 20 приведены значения моноизотопных масс, для продуктов 14, 15, 18 и 21 - среднелизотопных.

** Обозначения продуктов гидролиза как B^{X-Y} или B-цепь-(X-Y) идентичны.

^a Продукты гидролиза только протеиназой *Tv*.

^b Продукты гидролиза только пепсином А.

ти позволят использовать эти протеиназы в аналитической биохимии и биотехнологии.

Цель настоящей работы - изучение специфичности грибной аспартастной протеиназы из *Trichoderma viride* (протеиназы *Tv*) в отношении биоло-

гически активных олигопептидов инсулина и мелиттина по сравнению со специфичностью пепсина А и гастриксина.

Протеиназа *Tv* была выделена из препарата "Целловиридина" и очищена согласно методике,

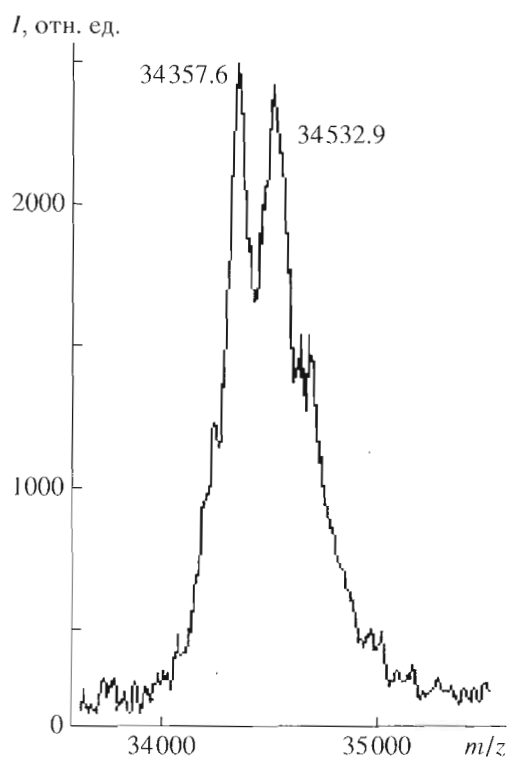


Рис. 2. Масс-спектрограмма гомогенного препарата протеиназы $T\gamma$ (фракции, отмеченные толстой линией на рис. 1б).

включающей в себя последовательную хроматографию обессоленного препарата на Q-сефарозе и высокоэффективную хроматографию на колонке с сорбентом Моно Q (рис. 1, табл. 1).

Полученный препарат фермента был электрофоретически гомогенен и состоял, по-видимому, из двух изоформ, так как в масс-спектре был представлен двумя квазимолекулярными ионами с m/z 34533 и 34357 (рис. 2), что характерно для ферментов из грибов [5].

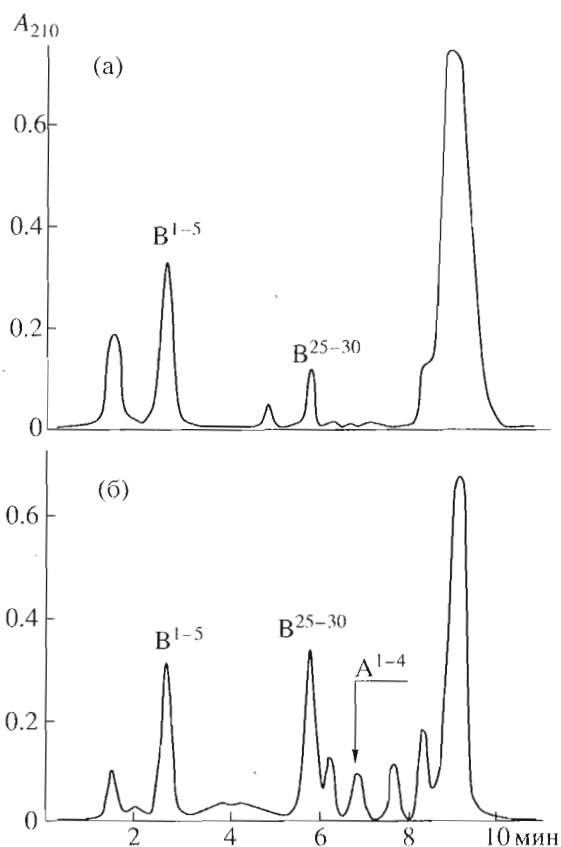


Рис. 3. Хроматограммы смеси продуктов расщепления нативного инсулина свиньи пепсином А (а) и протеиназой $T\gamma$ (б). Время инкубации гормона с ферментами 72 ч (условия см. в "Эксперимент. части").

Для предварительного сравнительного исследования специфичности грибной протеиназы $T\gamma$ и пепсина А свиньи был выбран инсулин – белок, который наиболее часто используется для характеристики специфичности протеиназ, несмотря на то что при его гидролизе не учитывается влияние пространственной структуры нативного гормона на типы разрываемых связей.

Хроматограммы смеси продуктов гидролиза нативного инсулина свиньи этими ферментами приведены на рис. 3. Продукты протеолиза иден-

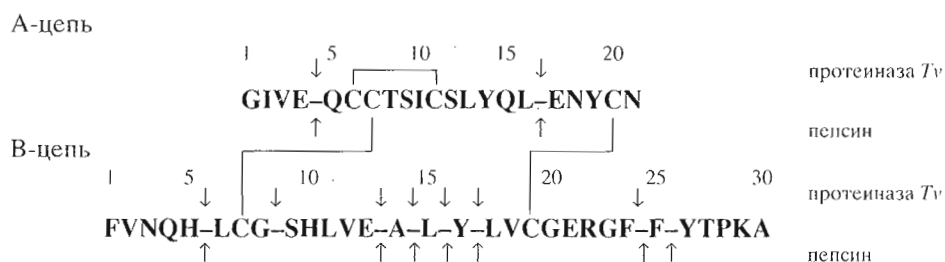


Схема 1. Расщепление нативного инсулина свиньи пепсином А (↑) и протеиназой $T\gamma$ (↓).

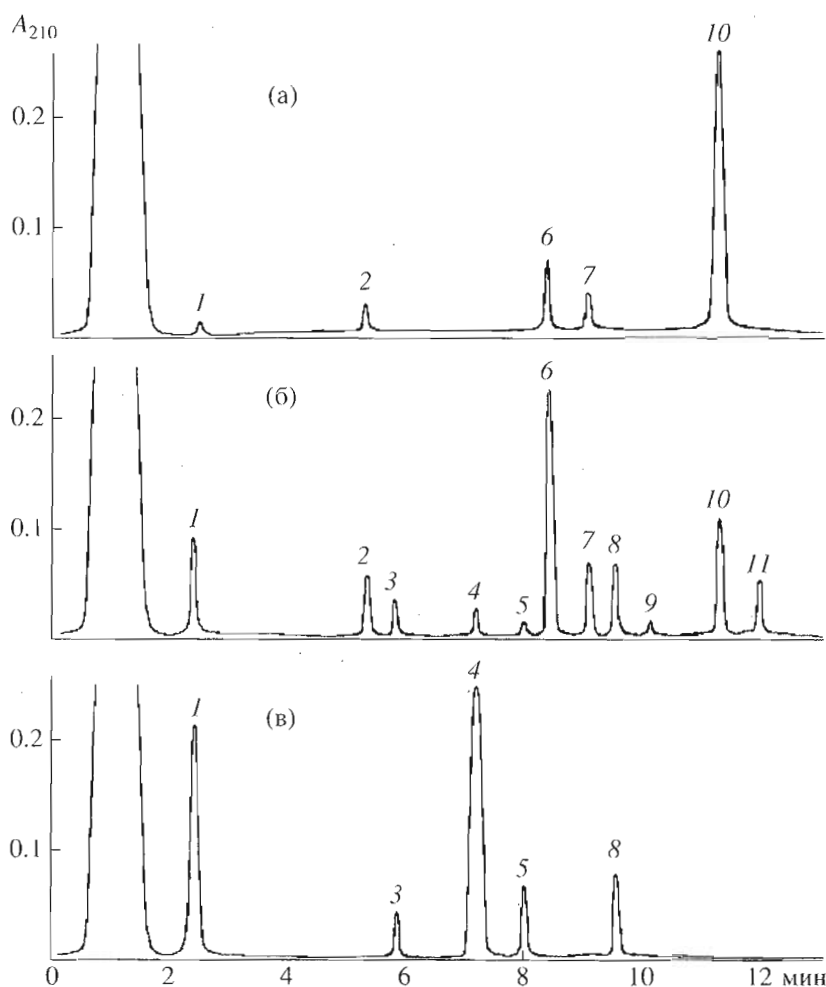


Рис. 4. Хроматограммы смеси продуктов расщепления мелиттина протеиназой *Tv*. Нумерацию пиков см. в табл. 3. Время инкубации пептида с ферментом – 11 (а), 100 (б) и 300 мин (в).

тифицированы масс-спектрометрически ESI-MS- и MALDI-MS-методами. Однако прямым масс-спектрометрическим анализом хроматографических фракций удалось идентифицировать лишь короткие продукты гидролиза – А-цепь-(1–4) (или А^{1–4}), В-цепь-(1–5) (или В^{1–5}) и В-цепь-(25–30) (или В^{25–30}) (рис. 3). Наличие в молекуле инсулина трех дисульфидных связей не позволило использовать высокомолекулярные продукты расщепления для однозначного определения мест разрывов в белке.

Поэтому для идентификации остальных продуктов гидролиза и тем самым для обнаружения

всех разрываемых связей в инсулине алиquotы хроматографических фракций и суммарных гидролизатов восстанавливали дитиотреитом непосредственно на мишени масс-спектрометра. В табл. 2 представлены результаты масс-спектрометрической идентификации всех восстановленных продуктов гидролиза инсулина свиньи протеиназой *Tv* и пепсином А. На основании этих данных представлена схема расщепления инсулина обеими аспаргатными протеиназами (схема 1). Наблюдается значительное совпадение сайтов гидролиза для двух ферментов, хотя имеются и

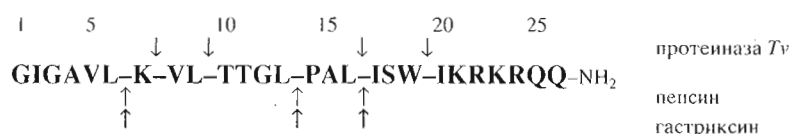


Схема 2. Расщепление нативного мелиттина пепсином А (↑), гастринсином (↑) и протеиназой *Tv* (↓).

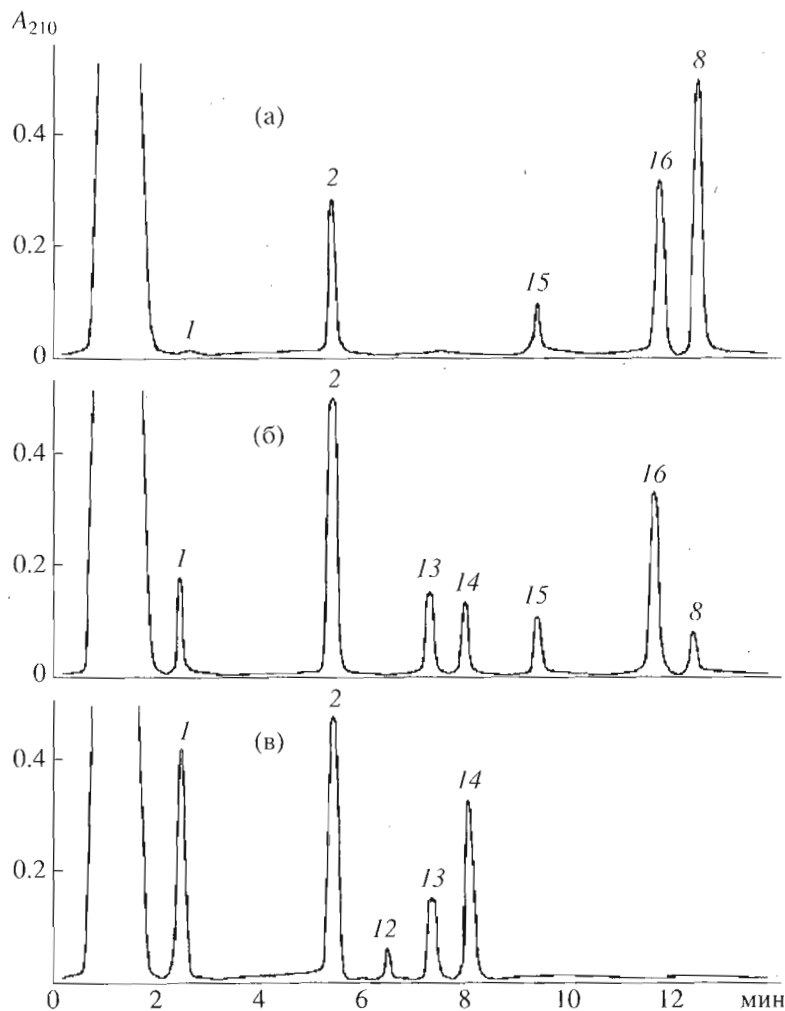


Рис. 5. Хроматограммы смеси продуктов расщепления мелиттина пепсином А. Нумерацию пиков см. в табл. 3. Время инкубации пептида с ферментом – 4 (а), 15.5 (б) и 144 мин (в).

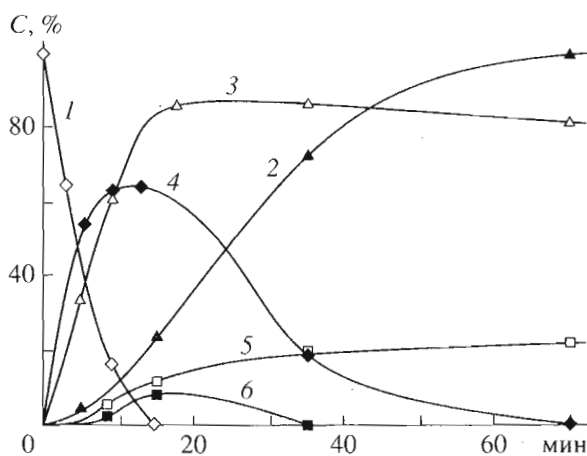


Рис. 6. Кинетика гидролиза мелиттина пепсином А. Концентрация мелиттина (Mel) и его фрагментов выражена в процентах от начальной молярной концентрации мелиттина: 1 – Mel; 2 – Mel-(7–16); 3 – Mel-(17–26); 4 – Mel-(1–16); 5 – Mel-(14–26); 6 – Mel-(7–26).

различия, касающиеся расщепления связей Gly⁸–Ser⁹ и Phe²⁵–Tyr²⁶ в В-цепи инсулина.

Другим субстратом, использованным для сравнительного исследования специфичности протеиназы Tv и пепсина А был мелиттин. Ранее этот природный олигопептид был применен при изучении специфичности различных сериновых протеиназ [6]. Представлялось интересным выявить особенности расщепления этого же пептида аспартатными протеиназами, различными и по происхождению, и, вероятно, по специфичности.

Прежде всего было показано, что протеиназа Tv и пищеварительные ферменты – пепсин А и гастрексин – эффективно гидролизуют мелиттин с образованием разного набора пептидных продуктов (рис. 4 и 5). В случае мелиттина удалось провести прямую масс-спектрометрическую идентификацию фракционированных продуктов расщепления пептида обеими протеиназами (табл. 3). Гидролиз мелиттина гастрексином был

Таблица 3. Продукты гидролиза мелиттина пепсином А и аспартатной протеиназой *Tv*

Номер пика ВЭЖХ*	Масс-спектрометрические данные, m/z	Молекулярная масса, Да		Продукты
		измеренная	расчетная	
1	955.6	954.6	955.6	Mel-(20–26)
2	1342.4	1341.4	1341.6	Mel-(17–26)
3	329.3 ^{2*}	656.6	656.7	Mel-(1–7) ^{3*}
4	672.6	671.6	671.8	Mel-(10–16) ^{3*}
5	885.1	884.1	884.1	Mel-(8–16)
6	1996.3	1995.3	1995.4	Mel-(10–26) ^{3*}
	869.8	868.8	869.1	Mel-(1–9) ^{3*}
7	2208.1	2207.1	2207.7	Mel-(8–26) ^{3*}
8	1059.4	1058.4	1058.2	Mel-(10–19) ^{3*}
9	1271.8	1270.8	1270.5	Mel-(8–19) ^{3*}
10	2846.8	2845.8	2846.5	Мелиттин (Mel)
11	1911.0	1910.0	1909.3	Mel-(1–19) ^{3*}
12	732.03	731.03	730.91	Mel-(7–13) ^{4*}
13	1626.3	1615.3	1622.97	Mel-(14–26) ^{4*}
14	1014.12	1013.12	1012.26	Mel-(7–16) ^{4*}
15	2337.1	2336.1	2335.86	Mel-(7–26) ^{4*}
16	1522.6	1521.6	1522.9	Mel-(1–16)

* См. рис. 4 и 5.

2* Данные ESI-MS-метода ($z = 2$).3* Продукты гидролиза только протеиназой *Tv*.

4* Продукты гидролиза только пепсином А.

Таблица 4. Сравнительные характеристики гидролиза наиболее быстро расщепляемых связей пепсином А и протеиназой *Tv*

Фермент	Разрываемая связь	Относительная скорость*	$K_m \times 10^5, M$	$(k_{cat}/K_m) \times 10^{-5}, c^{-1} M^{-1}$
Пепсин А свиньи	Leu ¹⁶ –He ¹⁷	0.9	21.5	0.84
	Leu ⁶ –Lys ⁷	0.1	–	–
Протеиназа <i>Tv</i>	Leu ⁹ –The ¹⁰	0.7	1.5	2.8
	Lys ⁷ –Val ⁸	0.3	–	–

* За единицу принята скорость гидролиза, измеренная по убыли мелиттина.

исследован при практически исчерпывающем гидролизе субстрата. Было показано, что сайты расщепления мелиттина в данном случае аналогичны таковым для пепсина А (схема 2), и никаких особенностей в специфичности гастриксина при гидролизе мелиттина в отличие от гидролиза сурфагона [7] не наблюдалось.

На схеме 2 показаны связи, разрываемые в мелиттине тремя аспартатными протеиназами. В табл. 4 приведены относительные значения скоростей гидролиза наиболее быстро гидролизуе-

мых связей и соответствующие им кинетические параметры, измерить которые позволила высокая чувствительность примененных масс-спектрометрических методов.

Из приведенных результатов следует, что специфичности протеиназы *Tv* и пепсина А несколько различаются. Особенно важно отметить разрыв связи Lys⁷–Val⁸ протеиназой *Tv*. Гидролиз связей, образованных карбоксильными группами основных остатков, характерен для пенициллопепсина и других грибных аспартатных протеи-

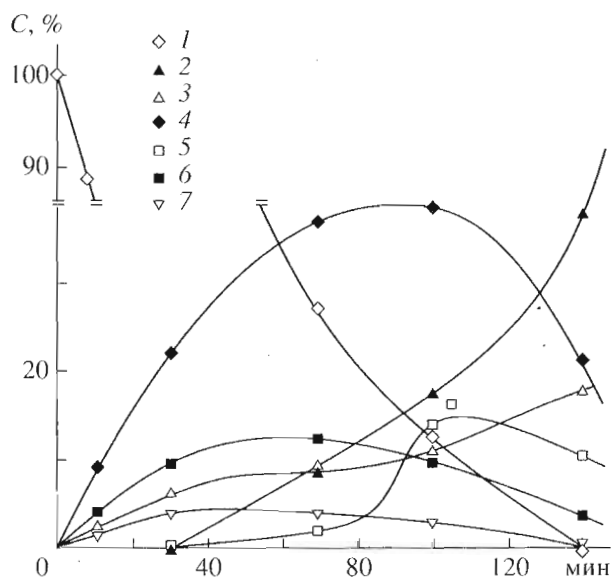


Рис. 7. Кинетика гидролиза мелиттина протеиназой *Tv*. Концентрация мелиттина (Mel) и его фрагментов выражена в процентах от начальной молярной концентрации мелиттина: 1 – Mel; 2 – Mel-(10–19); 3 – Mel-(17–26); 4 – Mel-(10–26); 5 – Mel-(8–19); 6 – Mel-(8–26); 7 – Mel-(1–19).

наз – таких, например, как эндотиапепсин и ризо-пуспепсин [8].

Кинетические зависимости убыли мелиттина и накопления продуктов его гидролиза пепсином А и протеиназой *Tv* показаны на рис. 6 и 7. По результатам кинетических данных были определены первичные сайты протеолиза мелиттина, что позволило предложить вероятные пути деградации олигопептида этими ферментами (схемы 3 и 4).

Хорошо известно, что все аспартатные протеиназы имеют оптимальный pH действия в области кислых значений. Для двух протеиназ (протеиназы *Tv* и сходной с ней грибной протеиназы из *Trichoderma lignorum*) оптимальный pH расщепления гемоглобина или створаживания молока соответствует ≈ 2.3 и 2.8 [9]. В экспериментах по гидролизу гемоглобина протеиназа *Tv* при изменении pH гидролиза с 2.0 до 3.1 увеличивала свою активность

примерно в 1.9 раза, тогда как активность пепсина А в этих же условиях уменьшалась в 8 раз [10].

Используя мелиттин в качестве субстрата, мы показали, что pH-оптимум функционирования протеиназы *Tv* равен 3. Некоторые различия в pH-зависимостях протеиназ *Trichoderma* sp. связаны, по-видимому, с различием выделяемых изоформ ферментов. Однако отсутствие структурных характеристик исследуемых белков не позволяет сделать окончательных выводов.

Сопоставляя специфичность, pH-зависимость и скорости гидролиза наиболее быстро разрывающихся связей в олигопептидах под действием протеиназы *Tv*, пепсина А и гастриксина, мы пришли к выводу, что по характеру действия изучаемый нами фермент аналогичен другим аспартатным протеиназам из грибов [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы пепсин А свиный, инсулин свиный (Sigma), гастриксин и мелиттин (Serva), гемоглобин крови лошади (Reanal), дитиотреит, ацетонитрил и трифторуксусная кислота (Merck). Остальные реактивы имели квалификацию ч. д. а. и “для спектрального анализа”.

Протеолитическую активность протеиназ определяли по расщеплению гемоглобина по методике, приведенной в работе [1], для протеиназы *Tv* и согласно [11] для пепсина и гастриксина. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях определения вызывало приращение оптического поглощения субстрата при 280 нм на единицу за 10 мин для протеиназы *Tv* и на 0.001 за 1 мин для пепсина и гастриксина.

Выделение и очистка протеиназы *Tv*. 2 г коммерческого препарата “Целловиридина 4000” (Приволжский биохимический завод, Россия) с удельной активностью по расщеплению гемоглобина 0.14 ед. акт./ОЕ₂₈₀ растворяли в 20 мл воды и обессоливали на колонке (4 × 30 см) с сефадексом G-50 (coarse) (Pharmacia, Швеция), уравновешенным водой. Обессоленный препарат наносили на колонку (1.6 × 20 см) с Q-сефарозой, уравновешенной 0.05 М фосфатным буферным раство-

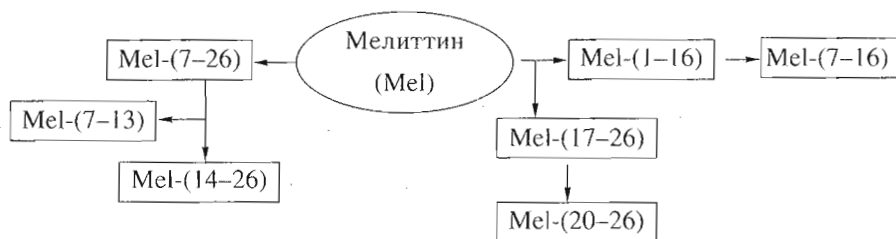


Схема 3. Основные пути расщепления мелиттина пепсином А.

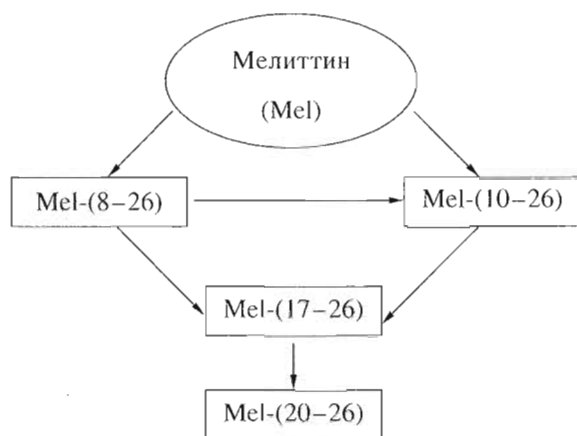


Схема 4. Основные пути расщепления мелиттина протеиназой *Tv*.

ром, pH 6.1. Затем промывали колонку 10-кратным объемом этого же буфера, после чего проводили элюирование градиентом концентрации раствора NaCl от 0 до 0.5 М (450 мл). Фракции, обладающие высокой протеолитической активностью ($[NaCl] = 0.31-0.49$ М), объединяли и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным 0.02 М Na-ацетатным буфером, pH 5.1. Фракции, содержащие белок, концентрировали ультрафильтрацией на мембране PM-10 (Amicon, США). Сконцентрированный раствор фракционировали ВЭЖХ на колонке (5 × 50 мм) со смолой Моно Q, уравновешенной 0.02 М Na-ацетатным буфером, pH 5.1. Элюцию осуществляли градиентом концентрации раствора NaCl от 0 до 0.5 М (8 мл) в том же буфере. Фракции, содержащие протеиназу *Tv* ($[NaCl] = 0.36-0.42$ М), диализовали против воды и лиофилизировали.

Электрофорез белков осуществляли согласно методике [12].

Гидролиз инсулина и мелиттина проводили при 25°C в 1% уксусной кислоте при pH 2.9, периодически отбирая из реакционной смеси аликвоты объемом 10 мкл. Концентрация гидролизующих пептидов и ферментов составляла 0.2 и 10⁻³ мг/мл соответственно. Перед фракционированием методом ВЭЖХ реакцию в пробах останавливали либо кипячением (при гидролизе субстратов протеиназой *Tv*), либо защелачиванием 0.2 М Трис-буфером (в случае гидролиза пепсином А и гастриксином) до pH 9–10. Содержание пептидных продуктов гидролиза оценивали, используя молярные коэффициенты поглощения, рассчитанные по аддитивной схеме [13].

ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе “Милихром” (ПО “Научприбор”) в колонке из нержавеющей стали (2 × 62 мм) с сорбентом Nucleosil 5 C₁₈ (Macherey Nagel).

Объем вводимой пробы составлял 5–10 мкл. Элюцию осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 50% (по объему) в растворе 0.1% трифторуксусной кислоты со скоростью 0.1 мл/мин.

Масс-спектрометрический анализ хроматографических фракций проводили на времяпролетном масс-спектрометре с электродинамическим источником ионов ESI-MS-методом [14]. Аликвоты хроматографических фракций высушивали, остаток растворяли в 70% (по объему) водном метаноле и вводили раствор в масс-спектрометр со скоростью 0.2 мкл/мин. Время регистрации составляло 30 с. Масс-спектры реакционных смесей без фракционирования снимали на масс-спектрометре Bruker Reflecton MALDI-MS-методом, как описано в работе [15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang J. // *Methods Enzymol.* 1970. V. 19. P. 406–421.
2. Fruton J.S. // *Adv. Enzymol.* 1976. V. 44. P. 1–36.
3. Inagami T., Murakami K. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 252. P. 2978–2983.
4. Neustroev K.N., Golubev A.M., Firsov L.M., Ibcutlin F.M., Protasevich I.I., Makarov A.A. // *FEBS Lett.* 1993. V. 316. P. 157–160.
5. Лобарева Л.С., Степанов В.М. // *Успехи биол. химии.* 1978. Т. 19. С. 83–105.
6. Mirgorodskaya O.A., Kazanina G.A., Mirgorodskaya E.P., Vorotyntseva T.I., Zamolodchikova T.S., Alexandrov S.L. // *Protein Pept. Lett.* 1996. V. 3. P. 315–320.
7. Миргородская О.А., Савельева Н.В., Симанкова А.Н., Шевченко А.А., Александров С.Л. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 611–615.
8. Hofmann T., Hodges R.S., James M.N.G. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 635–643.
9. Гайда А.В., Остерман А.П., Руденская Г.Н., Степанов В.М. // *Биохимия.* 1981. Т. 46. С. 181–189.
10. Clement G.E., Rooney J., Zakheim D., Eastman J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1970. V. 92. P. 186–189.
11. Anson M. // *J. Gen. Physiol.* 1938. V. 22. P. 79–84.
12. Laemmli V.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
13. Yang C.-Y., Downal H.J., Gotto A.M. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 145. P. 67–72.
14. Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Miroshnikov A.I. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 99–107.
15. Миргородская О.А., Казанина Г.А., Миргородская Е.П., Шевченко А.А., Мальцев К.В., Мiroshnikov A.I., Ройнсторфф П. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 91–97.

Specificity of Aspartic Protease from Fungus *Trichoderma viride* in the Hydrolysis of Oligopeptides

A. N. Simankova*, O. A. Mirgorodskaya**#, N. V. Savel'eva*, A. N. Savel'ev**,
R. Kerner***, P. Rijstorff***, and S. L. Alexandrov****

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 198103 Russia

**State Technical University, St. Petersburg, Russia

***Odense University, Denmark

****Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

We isolated, purified, and characterized an aspartic protease from fungus *Trichoderma viride*. The pH-dependence of the enzyme functioning was determined, and its specificity in the limited proteolysis of insulin and melittin was compared to the specificities of pepsin A and gastricsin. The kinetics of melittin hydrolysis by these enzymes was studied by mass spectrometry.

Key words: fungal aspartic proteases, pepsin A, gastricsin, melittin, insulin, proteolysis, kinetics, specificity, mass spectrometry

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 247-3795; fax: +7 (812) 247-0341;
e-mail: oam@om1533.shp.ru.