



УДК 577.152.342*2.02

ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ – НОВОЕ ПОДСЕМЕЙСТВО ХИМОТРИПСИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

© 1998 г. Г. Н. Руденская*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва

Поступила в редакцию 24.11.97 г. Принята к печати 26.12.97 г.

В обзоре представлены сведения о физико-химических, энзиматических свойствах и структурных особенностях известных в настоящее время глутамилэндопептидаз микроорганизмов, специфически расщепляющих связи глутаминовой и аспарагиновой кислот в пептидах и белках.

Ключевые слова: глутамилэндопептидазы, субстратная специфичность, молекулярные свойства.

Класс сериновых протеиназ объединяет разнообразные эндопептидазы, которые по отношению к субстратам можно разделить на три группы. Трипсин и трипсиноподобные ферменты проявляют наибольшую специфичность к субстратам, содержащим в положении P_1 остатки Arg и Lys с положительно заряженными боковыми цепями. Гидролиз пептидных связей, образованных гидрофобными, прежде всего ароматическими, аминокислотами, характерен для химотрипсина и его аналогов, для субтилизиноподобных протеиназ; связи, образованные аминокислотами с небольшими неполярными боковыми цепями, предпочтительно гидролизуются эластазоподобными ферментами. В настоящее время выявляется четвертая группа сериновых протеиназ, специфичность действия которых целиком определяется присутствием в субстрате отрицательно заряженных боковых цепей глутаминовой или аспарагиновой кислот.

К числу таких ферментов относятся так называемые Glu,Asp-специфичные протеиназы (или глутамилэндопептидазы) микроорганизмов. Впервые они были выделены из стафилококков (КФ 3.4.22.13) [1–3], позднее из актиномицетов [4, 5], стрептомицетов [6–9] и бацилл [10–15]. По-видимому, эти ферменты широко представлены в микроорганизмах, тем не менее описано таких протеиназ немного. Узкая субстратная специфич-

ность делает глутамилэндопептидазы удобным инструментом при изучении аминокислотной последовательности белков [16, 17], локализации активных центров многофункциональных ферментов [18] и для ферментативного синтеза пептидов [19, 20].

В табл. 1 приведены свойства известных глутамилэндопептидаз. Это ферменты с молекулярной массой 18–26.5 кДа, изоэлектрические точки их варьируют в широком интервале pH. Интересной особенностью обсуждаемых ферментов является наличие одного pH-оптимума в щелочной области pH при гидролизе пептидных субстратов и двух pH-оптимумов при гидролизе белковых субстратов. Факт наличия двух pH-оптимумов не получил до настоящего времени удовлетворительного объяснения, подтвержденного экспериментом. Следует обратить внимание на значительное различие в величинах K_m протеиназ патогенных стафилококков и других микроорганизмов. У протеиназ непатогенных микроорганизмов удельная активность как по белковым, так и по пептидным субстратам на порядок выше [4, 5, 9].

Глутамилэндопептидазы весьма устойчивы к действию ингибиторов. Они полностью теряют активность только в присутствии диизопропилфторфосфата – специфического ингибитора сериновых протеиназ. Другой нередко используемый ингибитор сериновых протеиназ – фенилметилсульфонилфторид не оказывает влияния на активность. Для глутамилэндопептидазы BLPE [10] показано ингибирование хлорметилкетонами пептидов, такими, как Z-Leu-Glu-CH₂Cl, Z-Phe-Leu-Glu-CH₂Cl. Другие известные ингибиторы сериновых протеиназ, в том числе и белковые, не влияют на активность рассматриваемых ферментов. Единственный белковый ингибитор (BGIA) глутамилэндопептидазы SGPE был выделен из мякоти бутылочной тыквы *Momordia charantia* L. [21].

Сокращения: глутамилэндопептидазы из *Staphylococcus aureus* V8 – StV8PE, *St. aureus* 92гн – St92PE, *Bacillus subtilis* – BSPE, *B. licheniformis* – BLPE, *B. intermedius* – BIPE, *Actinomyces* sp. – A. sp. PE, *Thermoactinomyces* sp. – T. sp. PE, *Streptomyces griseus* – SGPE, *S. fradiae* – SFPE, *S. thermovulgaris* – STPE; pNA – *n*-нитроанилидогруппа.

*Факс: (7-095) 939-31-81;

e-mail: Rudenskaya@biorg.chem.msu.su

Таблица 1. Сравнительная характеристика глутамилэндopeптидаз микроорганизмов

Протеиназа	Молекулярная масса, кДа	рI	рН-Оптimum гидролиза субстратов		Интервал стабильности рН	Температурный optimum, °С	K _m *, мМ
			пептидных	белковых			
BIPE [15, 31]	22.768	8.4	8.0	7.5; 9.0	6.5–11.0	55; 65**	6.0
BSPE [12]	17–18	7.7	8.0			55**	
BLPE [10]	23.567	4.8	8.0	–	4.0–10.0	51	1.8
A. sp. PE [4]	25	5.7	8.5	6.0; 9.0	6.0–10.0	55	1.1
T. sp. PE [5]	23	–	8.5	8.5	5.0–11.0	55	
St92PE [3]	25	4.5	8.2	4.6; 8.0	5.0–10.0	40–45	10.0
StV8PE [1]	26.5	4.5	–	4.0; 7.8	3.5–9.5	45	28.4
STPE [6]	26	6.7	6.5	6.5; 8.0	6.0–10.0	55	1.25
SGPE [8]	18.336	8.4	8.8	–	5.0–8.0	–	
SFPE [9]	18.702	8.2	–	–	4.5–9.0		

* Для реакции гидролиза Z-Glu-pNA.

** В присутствии ионов Ca²⁺.

BGIA ингибирует SGPE с K_i 70 нМ в соотношении 1 : 1. Однако на глутамилэндopeптидазы StV8PE и BSPE этот ингибитор не действует; он не ингибирует также химотрипсин, трипсин, эластазу и папаин. На основании анализа первичной структуры авторы относят BGIA к семейству картофельного ингибитора химотрипсина. Показано [22], что замещение в P₁ остатка Leu18 на Glu в активном центре третьего домена овомукоида индюка превращает его в эффективный ингибитор SGPE, но не StV8PE.

Глутамилэндopeптидазы BLPE [10] и BSPE [13] в значительной степени теряют активность при увеличении концентрации EDTA. Это наблюдение привело авторов работы [12] к ошибочному отнесению BSPE к металлопротеиназам. Только после установления полной аминокислотной последовательности этого фермента стала очевидной его принадлежность к сериновым протеиназам.

Бациллярные глутамилэндopeптидазы можно назвать Ca-зависимыми ферментами, так как их активность и стабильность в значительной степени изменяются в зависимости от концентрации ионов кальция в среде. Например, удельная активность протеиназы BIPE [15] по расщеплению Z-Glu-pNA в присутствии 5 мМ Ca²⁺ увеличивается вдвое и остается на том же уровне при дальнейшем повышении концентрации ионов кальция до 10–30 мМ. Подобными свойствами обладает BLPE [10], у которой активность при увеличении концентрации Ca²⁺ от 4 до 30 мкМ возрастает на 80% и далее не изменяется. В присутствии ионов кальция повышается устойчивость некоторых глутамилэндopeптидаз к повышенным температурам [6, 10, 15].

Весьма интересен вопрос о субстратной специфичности глутамилэндopeптидаз. От известных протеиназ семейства химотрипсина и субтилизины эти ферменты отличаются тем, что гидролизуют в белках пептидные связи, образованные остатками Glu и Asp. Они обладают также эстеразной и амидазной активностью. Связи, образованные остатками глутамина и аспарагина, не гидролизуются [23]. Не расщепляются также пептиды, у которых ω-карбоксильные группы боковых цепей этерифицированы.

Из табл. 2 видно, что глутамилэндopeптидазы гораздо быстрее расщепляют связи глутаминовой кислоты, чем аспарагиновой, причем скорости могут различаться на 2 порядка. При уменьшении времени реакции можно осуществить гидролиз только по остаткам глутаминовой кислоты.

Таблица 2. Относительная скорость (%) гидролиза субстратов глутамилэндopeптидазами

Субстрат*	BLPE [11]	StV8PE [11]	SFPE [9]	BIPE [14, 15]	BSPE [12]
AcE-pNA	100	100			
AcD-pNA	0.5	1.3			
WocAAE-pNA	100	100	100		
WocAAD-pNA	0.8	2.5	11.4		
WocAAPЕ-pNA					100
WocAAPD-pNA					0
RKE-VY				100	
RKD-VY				5.6	

* Дефисом обозначена гидролизуемая связь.

	154		168	171	183
SGPE	CSAGGDSGGA	HFAG-----	---SVALG H	S-GSSGCSGT	-AGSA H
SFPE	CSAGGDSGGA	HFAG-----	---SVALG H	S-GSSGCSGT	N-GSA H
BJPE	DTFSGNSGSA	VLDQNQQI--	-----VGVH	NAGYSNGTI-	NAGGPKA
BLPE	DTYGGQSGSP	VI-EQSSRTN	CSGPCSLAVH	TNGVYGGSSY	NRGTRIT
BSPE	DTYGCQSGSP	VYRNYSDT--	--GQTA A H	TNG---GSSY	NLGTRVT
SiV8PE	STTGGNSGSP	VFNFKNEV--	----- G H	WGGVPNEF--	N-GAVFI
Химотрипсин	SSCMGDSGGP	LVCKKNGA---	---WTLVG V	SWGSS TCSTS	TPGVYAL
	190	195	213	217	230

Рис. 2. Сравнение участков последовательностей глутамилэндопептидаз и химотрипсина, включающих остаток Ser активного центра и зоны связывания субстрата. Звездочкой отмечены совпадающие аминокислоты. Цифры соответствуют нумерации остатков в последовательности SGPE (вверху) и химотрипсина (внизу). Подчеркнута "триада гистидинов" у SGPE и SFPE.

ческие ферменты, в том числе и химотрипсиноподобные SGPA и SGPB, первичные и третичные структуры которых уже известны [32, 33]. В работе [30] было показано, что степень подобия первичных структур SGPE и SGPA составляет 59%, а SGPE и SGPB – 56%. На основании сходства первичных структур и известной кристаллической структуры SGPA была предложена модель третичной структуры SGPE [34]. Оказалось, что сравниваемые ферменты обладают характерной для химотрипсиноподобных протеиназ укладкой полипептидной цепи. Главное отличие наблюдалось в сайте S₁ зоны связывания субстрата. Было показано, что N^o1 остатка His213* может образовывать одну или несколько водородных связей с глутаминовой кислотой в положении P₁. Определенную роль в образовании наиболее существенных водородных связей играют гидроксильные группы остатков Ser190 и Ser217. Для компенсации отрицательного заряда субстрата важен также Lys138.

Китадокоро с сотр. [35] установили третичную структуру химотрипсиноподобной эндопептидазы из *Streptomyces fradiae* (S-Fase 2). На основании полученных данных и 57%-ной гомологии первичных структур авторами была сделана попытка предсказать третичную структуру глутамилэндопептидазы S-Fase 1 (SFPE). В этой же работе проводились также сравнения с третичными структурами SGPA и SGPB. Оказалось, что окрестности фрагментов активного центра у всех этих ферментов гомологичны. Основное отличие обнаруживается в строении зон связывания субстрата. У ферментов, специфичных к кислым аминокислотам, в районе Ser154 (нумерация по SGPE) находятся три положительно заряженных остатка гистидина (рис. 2), которые, возможно, способ-

ствуют нейтрализации отрицательно заряженных остатков Glu и Asp.

Третичная структура комплекса протеиназы SGPE с продуктом гидролиза субстрата Boc-Ala-Ala-Pro-Glu-OH, связанным в активном центре, была впервые получена в работе [36]. Рентгеноструктурный анализ подтвердил предположение о том, что компоненты активного центра His57, Asp102 и Ser195 и общая укладка полипептидной цепи гомологичны для SGPE и панкреатических сериновых протеиназ. Идентифицированы остатки, важные для специфичности SGPE: His213, Ser190 и Ser217. Гипотеза о необходимости для связывания субстрата остатков His199 и His230 [36] оказалась несостоятельной.

Для выявления роли важных для активности SGPE аминокислотных остатков были получены мутантные белки [37]. Замещение остатков активного центра His57, Asp102 и Ser195 оказалось существенным для секреции и продукции активного фермента. Замещение Ser190 и His213 на любые другие аминокислоты предотвращало образование зрелого фермента, что указывает на важность этих остатков для активации SGPE и для узнавания остатка Glu в субстрате. Остаток Ser217 оказался менее существенным для узнавания субстрата и, возможно, необходим для стабилизации структуры. Исследовалась роль триады гистидинов. Мутанты по His230 не теряли каталитической активности и не изменяли субстратную специфичность. Замещение His230 остатком Ala привело к 300-кратному возрастанию величины k_{cat}/K_m для субстратов с аспарагиновой кислотой. Каталитические параметры для субстратов с глутаминовой кислотой оказались такими же, как у дикого типа. Остаток His199 оказался важным для правильной ориентации второго гистидина (His213).

Таким образом, метод направленного мутагенеза не подтвердил необходимость триады гисти-

*Здесь и далее, если особо не указано, нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации аминокислотных остатков в последовательности химотрипсина.

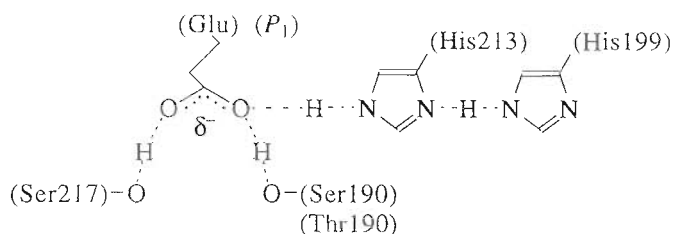


Рис. 3. Предполагаемый механизм связывания субстрата глутамилэндопептидазами. Цифры соответствуют нумерации остатков химотрипсина.

динов для эффективного связывания субстратов глутамилэндопептидазами. В связи с этим авторы работы [37] предложили другую модель связывания остатка глутаминовой кислоты субстрата (рис. 3), которая объясняет возможность компенсации отрицательного заряда субстрата участием в процессе связывания двух остатков серина. Предложенная схема также не может претендовать на универсальность, так как у бациллярных глутамилэндопептидаз остатки серина в соответствующих местах полипептидных цепей отсутствуют (рис. 2). Однако у бациллярных глутамилэндопептидаз наблюдается консервативная замена Ser190 на Thr (рис. 2), который, возможно, способен выполнять ту же функцию, что и у протеиназ стрептомицетов.

Таким образом, на основании сравнения известных первичных и пространственных структур глутамилэндопептидаз и химотрипсиноподобных ферментов близкородственных микроорганизмов можно сделать вывод о принадлежности глутамилэндопептидаз ферментов к особому подсемейству сериновых протеиназ, относящемуся к семейству химотрипсина, но вопрос о механизме связывания субстрата окончательно не решен

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-50-162).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drapeau G.R., Boily Y., Houtard J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 6720–6726.
2. Yoshikawa K., Tsusuki H., Fujiwara T., Nakamura E., Iwamoto H., Matsumoto K., Shin M., Yoshida N., Teraoka H. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1221. P. 221–228.
3. Беляева Е.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Дегтева Г.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 1984. Т. 20. С. 363–368.
4. Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Ходова О.М., Цаплина И.А. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 414–422.
5. Демидюк И.В., Носовская Е.А., Цаплина И.А., Каравайко Г.И., Костров С.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 202–207.
6. Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П., Степанов В.М., Егоров Н.С. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 46–52.
7. Ревина Л.П., Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Гребенищikov Н.И., Баратова Л.А., Степанов В.М. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 846–850.
8. Yochida N., Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K., Makisumi S. // J. Biochem. 1988. V. 104. P. 451–456.
9. Kitadokoro K., Nakamura E., Tamaki M., Horii T., Okamoto H., Shin M., Sato T., Fujiwara T., Tsuzuki H., Yoshida N., Teraoka H. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1163. P. 149–157.
10. Svedsen J., Breddam K. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 165–171.
11. Kakudo S., Kikuchi N., Kitadokoro K., Fujiwara T., Nakamura E., Okamoto H., Shin M., Takami M., Teraoka H., Tsuzuki H., Yoshida N. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 23782–23788.
12. Sloma A., Rudolph C.F., Rufo G.A., Sullivan B.J., Theriault K.A., Ally D., Pero J. // J. Bacteriol. 1992. V. 172. P. 1024–1029.
13. Niidome T., Yoshida N., Ogata F., Ito A., Noda K. // J. Biochem. 1990. V. 108. P. 965–970.
14. Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovich E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // FEBS Lett. 1997. V. 404. P. 241–244.
15. Лецинская И.Б., Шакиров Е.В., Ицкович Е.Л., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Благова Е.В., Левдикова В.М., Куранова И.П., Руденская Г.Н., Степанов В.М. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1052–1059.
16. Сурова И.А., Ревина Л.П., Янонис В.В., Колесникова Л.А., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 1310–1326.
17. Elliot B.W., Cochen J., Cochen C. // J. Biol. Chem. 1988. V. 264. P. 11256–11259.
18. Akhkeruzman M., Sumio T., Hong J., Hizoshe M. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 955. P. 77–85.
19. Widmer F., Bayne S., Hougen G., Moss B.A., Rigby B.A., Whittaker R.G., Johannsen J.T. // Peptides. 1984 / Ed. U. Ragnarsson. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1984. P. 193–200.

20. Schuster M., Aaviksaar A., Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Jakubke H.D. // *Biomed. Biochim. Acta.* 1991. V. 50. P. 139-143.
21. Ogata F., Miyata T., Fujii N., Yoshida N., Noda K., Makisumi S., Ito A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 16715-16721.
22. Komiyama T., Bigler T., Yoshida N., Noda K., Laskowski M., Jr. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 10727-10730.
23. Houmard J., Drapeau G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. P. 3506-3509.
24. Drapeau G.R. // *Methods Enzymol.* 1976. V. 45. P. 469-475.
25. Ryden A.C., Ryden L. // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 44. P. 105-114.
26. Drapeau G.R. // *Methods Enzymol.* 1977. V. 47 (E). P. 181-191.
27. Deibler G.E., Nomura K., Kies M.N. // *J. Neurochem.* 1982. V. 39. P. 1090-1100.
28. Bogardt B.A., Dwulet F.E., Jr., Lehman L.D., Jones B.N., Gurd F.R.N. // *Biochemistry.* 1976. V. 14. P. 2597-2580.
29. Carmona C., Cray G.L. // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. P. 6757.
30. Svendsen I., Jensen M.R., Breddam K. // *FEBS Lett.* 1991. V. 292. P. 165-167.
31. Rebricov D.V., Akimkina T.V., Shevelev A.B., Demidyuk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M. // *J. Bacteriol.* In press.
32. Barbosa J.A.R.G., Garratt R.C., Saldanha J.W. // *FEBS Lett.* 1993. V. 324. P. 45-50.
33. Kitadokoro K., Tsuzuki H., Okamoto H., Sato T. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 224. P. 735-742.
34. Sielecki A.R., Hendrickson W.A., Broughton C.G., Delbaere L.T., Brayer G.D., James M.N. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 134. P. 781-804.
35. Kitadokoro K., Tsuzuki H., Nakamura E., Sato T., Teraoka H. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 220. P. 55-61.
36. Nienaber V.L., Breddam K., Birktoft J.J. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 11469-11475.
37. Stennicke H.R., Birktoft J.J., Breddam K. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 2266-2275.

Glutamylendopeptidases from Microorganisms, a New Subfamily of Chymotrypsin Proteases

G. N. Rudenskaya

Chemistry Department, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The physicochemical, enzymic, and structural characteristics of known glutamylendopeptidases of microbial origin that specifically cleave the bonds formed by glutamic and aspartic acids in proteins and peptides are reviewed.

Key words: glutamylendopeptidases, substrate specificity, molecular properties