

Я. РИЙКОЯ, Надежда ПАБЕРИТ,
Марет ПАНК, А. ААВИКСААР

ПЕРВИЧНАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ «СУПЕРАКТИВИРОВАННЫХ» МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

Работами Б. Л. Вэлли с сотрудниками [1, 2] было показано, что обработкой нейтральных протеиназ из *Bacillus thermoproteolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Aeromonas proteolytica* N-оксисукцинимидными эфирами ароматических ациламинокислот можно получить «суперактивные» формы, превосходящие по пептидазной активности нативные ферменты в десятки и даже в сотни раз. Степень активации зависит от природы модифицирующей ациламинокислоты и используемого субстрата. Доказано, что изменение активности термолизина из *Bacillus thermoproteolyticus* происходит в результате специфического ацилирования единственного остатка тирозина (Tyr-110) в молекуле фермента [3]. Этот остаток, по-видимому, расположен вблизи субцентра S_1 для связывания боковой цепи аминокислоты в положении P_1 субстрата (номенклатура по [4]): эффект активации при ацилировании фермента наблюдался только для субстратов, содержащих Gly или Ala в положении P_1 ; по отношению к субстратам с Phe в этом положении активность модифицированного фермента оказалась меньшей, чем у нативного [1, 2]. Учитывая, что при переходе от FA—Gly—Leu—Gly к FA—Phe—Leu—Gly (FA — 3-(2-фурил)акрилоил) скорость гидролиза субстрата под действием нативного термолизина увеличивается в 27,7 раза, а активация термолизина, модифицированного N-оксисукцинимидным эфиром N-ацетил-L-фенилаланина, относительно FA—Gly—Leu—Gly составляет 20 раз [1], можно думать, что для субстратов, содержащих в положении P_1 аминокислоту с небольшой боковой цепью, присоединенный к Tyr-110 остаток ацетилфенилаланина (AcPhe) дополняет субстрат в его гидрофобном взаимодействии с субцентром S_1 , обеспечивая оптимальную каталитическую конформацию фермента. Если же в субстрате в положении P_1 находится фенилаланин, то между двумя группами возникает конкуренция за субцентр S_1 и взаимодействие субстрата с ферментом должно ухудшаться.

Поскольку специфический лиганд субцентра S'_1 , β -фенилпропионил-фенилаланин, не ингибирует реакцию модифицирования термолизина N-оксисукцинимидными эфирами ациламинокислот, и константа его связывания с модифицированными термолизинами совпадает с K_I для нативного фермента [1], можно думать, что модификация Tyr-110 не должна менять специфичность относительно аминокислотного остатка субстрата в положении P'_1 . Имеющиеся в литературе данные по субстратной специфичности тирозин-модифицированных активированных металлопротеиназ [1, 2], однако, не согласуются с этим предположением. Так, в случае FA—Gly—Ala—Gly AcPhe-термолизин увеличивает скорость гидролиза в 100 раз по сравнению с нативным ферментом, а в случае FA—Gly—Leu—Gly — лишь в 20 раз.

Для количественной оценки роли гидрофобной полости субцентра S'_1 в специфичности металлопротеиназ нами была использована серия хромогенных субстратов [5, 6] с общей формулой $FA-Gly-X-NH_2$ (X см. в табл. 1). В настоящей работе на этой серии изучена первичная субстратная специфичность двух металлоэндопептидаз, активированных с помощью N-оксисукцинимидного эфира N-ацетил-L-фенилаланина — термолизина и новой нейтральной металлопротеиназы, выделенной в нашей лаборатории из *Bacillus brevis* 7882 [6, 7].

Экспериментальная часть

Использовали трис фирмы «Reanal», перекристаллизованный из метанола, маленную кислоту марки «чда», NaOH, $CaCl_2$, $CoCl_2$ марки «хч». Синтез субстратов описан в [8]; N-оксисукцинимидный эфир N-ацетил-L-фенилаланина был синтезирован, как описано в [1], данные элементного анализа $C_{15}H_{16}N_2O_5$: C 59,48, N 9,30, H 5,44 (теорет.: C 59,20, N 9,21, H 5,30); т. пл. 153—154 °C.

Использовали термолизин фирмы «Calbiochem-Behring» (США); нейтральная металлопротеиназа *Bacillus brevis* 7882 была выделена в нашей лаборатории [6, 7]; запасные растворы ферментов готовили в буфере 0,05 М трис-HCl, pH 8,8, содержащем 5 мМ $CaCl_2$, и хранили при 4 °C.

Кинетику гидролиза субстратов измеряли на спектрофотометре «Varian Techtron 635» (Австралия) по уменьшению оптической плотности реакционной смеси при 322 нм, используя в расчетах $\Delta\epsilon_{322} = 2300$. Константы скоростей псевдопервого порядка и бимолекулярные константы гидролиза определяли, как описано в [6].

Ферменты модифицировали N-оксисукцинимидным эфиром N-ацетил-L-фенилаланина согласно [1] при концентрации реагента 5 мМ; модифицированный фермент выделяли гельфильтрацией на Sephadex G-25; размеры колонки 20×0,9 см.

Измерения для Co(II)-ферментов проводили, вводя Zn(II)-ферменты в растворы субстратов, содержащие 1 мМ $CoCl_2$. Как было показано ранее [9], ферментативная активность в этих условиях соответствует активности Co(II)-ферментов, полученных путем последовательного удаления цинка и введения кобальта в молекулу фермента.

В корреляциях использовали значения констант гидрофобности боковых цепей аминокислот π_R , приведенные в [6].

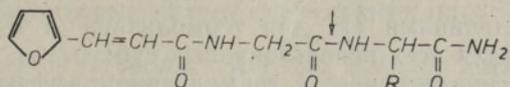
Результаты и их обсуждение

Бимолекулярные константы скорости гидролиза N-3-(2-фурил)акрилоил-глицил-X-амидов ($FA-Gly-X-NH_2$) под действием модифицированных термолизина и нейтральной металлопротеиназы *Bacillus brevis* 7882 (табл. 1) были проанализированы с помощью уравнения

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 + \phi \pi_R. \quad (1)$$

Выяснилось, что их первичная субстратная специфичность относительно аминокислотного остатка в положении P'_1 в дипептидных субстратах серии $FA-Gly-X-NH_2$ при активации не меняется. Из параметров корреляций (табл. 2) видно, что величины реакционной константы ϕ , характеризующей чувствительность активного центра фермента к изменению гидрофобности заместителя R в данной реакционной серии, для нативных и AcPhe-ферментов статистически неотличимы

Ферментативный гидролиз амидов N-фурилакрилоилглицил-аминокислот



модифицированными формами термолизина и нейтральной протеиназы *Bacillus brevis* 7882 (стрелкой указана гидролизуемая связь)

Номер соединения	Варьируемая аминокислота	R	$k_{II} \cdot 10^{-2}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$					
			Термолизин			Металлопротеиназа <i>B. brevis</i>		
			нативный с Co(II)	AcPhe	AcPhe с Co(II)	нативная с Co(II)	AcPhe	AcPhe с Co(II)
1	Ala	—CH ₃	0,69	2,04	3,06	0,294	1,93	2,74
2	Abu	—CH ₂ CH ₃	6,13	64,0	119	2,08	51,6	76,8
3	Val	—CH(CH ₃) ₂	16,8	78,5	224	7,43	43,4	75,5
4	Nva	—(CH ₂) ₂ CH ₃	46,5	385	616	13,4	242	336
5	Leu	—CH ₂ CH(CH ₃) ₂	191	1470	2390	83	593	718
6	Nle	—(CH ₂) ₃ CH ₃	57,1	222	377	13,9	200	336
7	Phe	—CH ₂ C ₆ H ₅	141	1450	1950	340	2620	3250

Обозначения: AcPhe — фермент, обработанный N-оксисукцинимидным эфиром N-ацетил-L-фенилаланина по методике [1] (см. текст).

Условия реакции: буфер 0,17 М трис-кислый малеат-NaOH, pH 7,2, 5 мМ CaCl₂, 25 °C; [S]₀=0,03–0,11 мМ; в случае Co(II)-ферментов концентрация Co(II) — 1 мМ.

Константы k_{II} определены со среднеквадратичной ошибкой 5%.

Таблица 2

Параметры корреляций по уравнению $\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 + \varphi_{LR}$

Ферментный препарат	Соединения из табл. 1, использованные в корреляциях	Значения определяемых параметров		Коэффициент корреляции	Стандартное отклонение
		$\lg k_{II}^0$	φ		
Термолизин*	1–5	0,7±0,1	1,9±0,3	0,997	0,082
Термолизин-Co(II)	1–5	0,91±0,06	1,85±0,06	0,998	0,059
AcPhe-термолизин	1–5	1,4±0,3	2,1±0,2	0,963	0,237
AcPhe-термолизин-Co(II)	1–5	1,6±0,3	2,2±0,2	0,968	0,225
Протеиназа 7882**	1–5,7	0,4±0,1	1,75±0,07	0,997	0,0995
Протеиназа-Co(II)	1–5,7	0,6±0,1	1,78±0,07	0,994	0,0975
AcPhe-протеиназа	1–5,7	1,6±0,3	1,7±0,2	0,955	0,258
AcPhe-протеиназа-Co(II)	1–5,7	1,9±0,3	1,7±0,2	0,954	0,254

* Данные из [5].

** Данные из [6].

друг от друга. Как и в случае нативных ферментов, $\lg k_{II}$ при X=Nle и Phe для термолизина и при X=Nle для протеиназы *Bacillus brevis* 7882 выпадают из корреляционной прямой по уравнению (1), что согласуется с представлением о различной глубине гидрофобных

полостей в активных центрах термоллизина и протеиназы *Bacillus brevis* [5, 6]. С другой стороны, степени активации AcPhe-ферментов, $k_{II}^{модиф}/k_{II}^{нат}$, рассчитанные по этим субстратам, хорошо согласуются со средними величинами (11 для термоллизина и 19 для протеиназы *Bacillus brevis*) для всех использованных субстратов.

Наблюдение аналогичного с термоллизинном эффектом активации при обработке N-оксисукцинимидным эфиром N-ацетил-L-фенилаланина протеиназы *Bacillus brevis* 7882 подтверждает предположение, что наличие активного тирозина вблизи субцентра S_1 может быть общим свойством микробных металлопротеиназ, закрепленным эволюцией [3].

Первичная субстратная специфичность ферментов не менялась также при замене Zn(II) в их активных центрах на Co(II), что приводило к аддитивной 1,5-кратной активации как нативных, так и модифицированных ферментов.

Из представленных данных можно сделать вывод, что ацилирование OH-группы Туг-110 в термоллизине (и аналогичного тирозина в протеиназе *Bacillus brevis* 7882) не затрагивает взаимодействия бокового радикала аминокислотного остатка P'_1 в дипептидных субстратах с гидрофобной полостью в активных центрах этих ферментов.

Однако отмеченная выше различная степень активации AcPhe-термоллизина для трипептидных субстратов FA—Gly—Ala—Gly и FA—Gly—Leu—Gly [1, 2] не позволяет распространить этот вывод на более длинные пептидные субстраты без дополнительной экспериментальной проверки. В этой связи непонятно также, отчего степень активации AcPhe-термоллизина по отношению к FA—Gly—Leu—Ala гораздо ниже (в 3,5 раза [1]), чем по отношению к FA—Gly—Leu—NH₂, FA—Gly—Leu—Gly и FA—Gly—Leu—Phe (в 20, 20 и 15 раз соответственно), в случае которых специфичность активированного фермента относительно P'_2 -остатка практически не меняется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blumberg, S., Vallee, B. L. Superactivation of thermolysin by acylation with amino acid N-hydroxysuccinimide esters. — *Biochemistry*, 1975, **14**, N 11, 2410—2419.
2. Holmquist, B., Blumberg, S., Vallee, B. L. Superactivation of neutral proteases: acylation with N-hydroxysuccinimide esters. — *Biochemistry*, 1976, **15**, N 21, 4675—4680.
3. Blumberg, S. Amino acid residue modified during superactivation of neutral proteases: tyrosine-110 of thermolysin. — *Biochemistry*, 1979, **18**, N 13, 2815—2820.
4. Schechter, I., Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, **27**, N 2, 157—162.
5. Pank, M., Kirret, O., Paberit, N., Aaviksaar, A. Hydrophobic interactions in thermolysin specificity. — *FEBS Letters*, 1982, **142**, N 2, 297—300.
6. Панк М., Киррет О., Паберит Н., Аавиксаар А. Специфичность нейтральной протеазы *Bacillus brevis* в реакции с дипептидными субстратами. — *Изв. АН ЭССР. Хим.*, 1983, **32**, № 3, 157—162.
7. Паберит Н. Ю., Панк М. С., Лийдерс М. А., Ванаталу К. П. Очистка и свойства нейтральной металлопротеазы *Bacillus brevis*. — *Биохимия*, 1984, **49**, № 2, 275—284.
8. Панк М., Киррет О. Синтез N-3-(2-фурил)акрилоилпептидов. — *Изв. АН ЭССР. Хим.*, 1979, **28**, № 4, 297—300.
9. Holmquist, B., Vallee, B. L. Metal substitutions and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme. — *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, N 14, 4601—4607.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
29/III 1984

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

J. RIIKOJA, Nadežda PABERIT, Maret PANK, A. AAVIKSAAR

«SUPERAKTIVEERITUD» METALLOPROTEINAASIDE
PRIMAARNE SUBSTRAATSPETSIIFILISUS

On näidatud, et termolüsiini ja *Bacillus brevis* 7882 neutraalse metalloproteinaasi substraatspetsiifilisused aminohappe X kõrvalahela suhtes N-3-(2-furüül)akrüloüül-glütsüül-X-amiidide (FA—Gly—X—NH₂) seerias, kus X=Ala, Abu, Val, Nva, Leu, Nle ja Phe, ei muutu, kui fermente «superaktiveerida» N-atsetüül-L-fenüülalaniini N-hüdrosüsuktsiiniimido-estriga või viia nende aktiivsetesse tsentritesse Zn(II) asemele Co(II). Kovalentse modifitseerimisega saadava aktivatsiooni aste (tingimustel: temperatuur 25 °C, pH 7,2, 0,17 M tris-maleaat-NaOH puhver) oli kõigi kasutatud substraatide kohta termolüsiini puhul keskmiselt 11 ning *B. brevis*'e proteaasi puhul 19, mida 1 mM Co(II) lisamine reaktsioonikeskkonda tõstis ligikaudu 1,5 korda.

J. RIIKOJA, Nadezhda PABERIT, Maret PANK, A. AAVIKSAAR

LEAVING GROUP SPECIFICITY OF «SUPERACTIVATED»
METALLOPROTEASES

It has been shown that «superactivation» of thermolysin and the neutral protease from *Bacillus brevis* 7882 by their chemical modification with N-acetyl-L-phenylalanine N-hydroxysuccinimide ester as well as the change of Zn (II) for Co (II) in their active sites do not change the specificities of these enzymes against the amino acid X side chain in the substrates Fa—Gly—X—NH₂, where X=Ala, Abu, Val, Nva, Leu, Nle and Phe. On the average, an 11-fold activation of thermolysin and 19-fold activation of the *B. brevis* protease at 25 °C and pH 7.2 in 0.17 M Tris-acid maleate-NaOH buffer has been observed, which was additionally increased about 1.5-fold in the presence of 1 mM Co(II) in the reaction medium.