

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  $S'_1$ ,  $\beta$ -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  $\pi_R$ , приведенные в [6].

### Результаты и их обсуждение

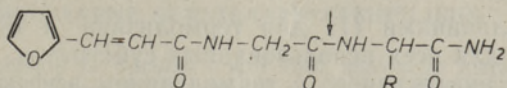
Бимолекулярные константы скорости гидролиза N-3-(2-фурил)акрилоил-глицил-X-амидов ( $FA-Gly-X-NH_2$ ) под действием модифицированных термолизина и нейтральной металлопротеиназы *Bacillus brevis* 7882 (табл. 1) были проанализированы с помощью уравнения

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

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  $\phi$ , 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 <sub>3</sub>	0,69	2,04	3,06	0,294	1,93	2,74
2	Abu	—CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6,13	64,0	119	2,08	51,6	76,8
3	Val	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	16,8	78,5	224	7,43	43,4	75,5
4	Nva	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	46,5	385	616	13,4	242	336
5	Leu	—CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	191	1470	2390	83	593	718
6	Nle	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	57,1	222	377	13,9	200	336
7	Phe	—CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	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 CaCl<sub>2</sub>, 25 °C; [S]<sub>0</sub>=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
		$\lg k_{II}^0$	$\varphi$		
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—NH<sub>2</sub>, 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 ( $\text{FA-Gly-X-NH}_2$ ) seerias, kus  $X = \text{Ala, Abu, Val, Nva, Leu, Nle}$  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  $\text{Fa-Gly-X-NH}_2$ , where  $X = \text{Ala, Abu, Val, Nva, Leu, Nle}$  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.