



УДК 577.156

ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ СВИНОГО ПЕПСИНА

*Ревина Л. П., Вахитова Э. А., Баратова Л. А.,
Белянова Л. П., Степанов В. М.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Проведен ограниченный протеолиз свиного пепсина (КФ 3.4.4.1), предварительно ингибированного N-диазоацетил-N'-2,4-динитрофенилэтилендиамином. Один из выделенных фрагментов содержит ковалентно связанный остаток диазоацетильного ингибитора. Фрагмент представляет собой C-концевую половинную молекулу пепсина, состоит из 146 аминокислот и, вероятно, сохраняет глобулярную структуру. Автоматическим методом Эдмана установлена его C-концевая последовательность. Высказано предположение, что C-концевая часть молекулы пепсина представляет собой компактную структуру (своего рода «домена»), устойчивую к протеолитической атаке.

Ограниченный протеолиз утвердился в последнее время как метод, позволяющий выявить в белках области, обладающие известной автономией структурной организации. Применение этого метода к исследованию протеиназ обычно осложнено автолитическими процессами. Указания на возможность ограниченного протеолиза пепсина (КФ 3.4.4.1) были получены в нашей лаборатории ранее [1], когда обнаружилось, что хроматография на DEAE-целлюлозе свиного пепсина, предварительно ингибированного N-диазоацетил-N'-2,4-динитрофенилэтилендиамином (ДДЭ), позволяет отделить от собственно ингибированного фермента высокомолекулярные продукты его расщепления, соответствующие N- и C-концевому участку белка. Однако такое расщепление удавалось получить не во всех опытах, что указывало на сильную зависимость процесса от содержания в ингибированном пепсине следов активного фермента, а также от небольших изменений в условиях, способствующих денатурации белка.

Целью данной работы явилось более подробное изучение условий ограниченного протеолиза ингибированного ДДЭ свиного пепсина и анализ образующихся при этом продуктов.

Для обеспечения воспроизводимости опытов по ограниченному протеолиту свиного пепсина, ингибирующего ДДЭ, мы существенно изменили описанную ранее методику [1], исходя из следующих представлений о характере процесса. Предпосылкой протеолитической атаки обычно устойчивой молекулы пепсина является некоторая дестабилизация ее пространственной структуры. Одним из факторов, ослабляющих стабильность глобулы, может служить присутствие объемистого гидрофобного остатка ингибитора. Однако более важным, по-видимому, является проведение протеолиза при значении pH, способствующем глубокой денатурации пепсина.

Присутствие активного пепсина имеет решающее значение для протеолиза. Ввиду этого мы не полагались, как это делали ранее, на содержание в препарате следов активного фермента, а добавляли пепсин к реакционной смеси в значительных количествах с учетом того, что его активность в условиях опыта была невысокой.

В качестве исходного материала использовали хроматографически чистый свиной пепсин, ингибированный ДДЭ при pH 5,0 в присутствии ионов двухвалентной меди, причем инактивация фермента происходила на 99—100%, и в молекулу белка включался один остаток ингибитора. Расщепление проводили в течение 15 мин при pH 6,45 и 33°, добавляя к ингибированному пепсину активный пепсин в соотношении 30 : 1.

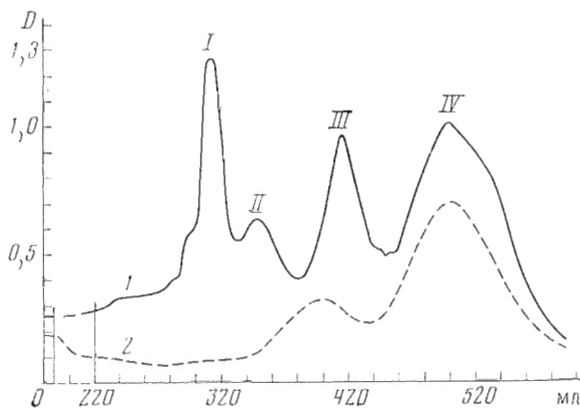


Рис. 1. Разделение смеси пептидов на DEAE-целлюлозе:
1 — D_{280} , 2 — D_{360}

Продукты гидролиза разделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе с применением градиента NaCl (0—1н.) в 0,1 н. ацетатном буфере при pH 5,0. Были получены четыре фракции (рис. 1), две из которых (III и IV) содержали диазоацетильный ингибитор.

Фракции I и II, по данным аминокислотного анализа, не содержали лизина и аргинина, но имели в составе остаток гистидина. Они плохо отделялись друг от друга при хроматографии на DEAE-целлюлозе, а при электрофорезе в полиакриламидном геле дали несколько зон. При гель-фильтрации на сефадексах G-25, G-50 и G-75 фракция I вела себя, как смесь пептидов небольшой длины. Пептидные карты показали наличие во фракциях I и II нескольких пептидов нейтрального и кислого характера. Таким образом, фракции I и II представляли собой смесь коротких пептидов, образовавшихся из N-концевого участка молекулы белка.

Из фракции III последовательной хроматографией на DEAE-целлюлозе и сефадексе G-75 был выделен чистый фрагмент III (см. далее схему 2), элюирующийся двумя фракциями: III-1 и III-2 (рис. 2).

При гель-фильтрации на сефадексе G-75 от фрагмента III отделялся 14-членный N-концевой пептид пепсина (фракция III-3, рис. 2), последовательность которого установлена с помощью секвенатора: $\text{Pe-Gly-Asp-Glu-Pro-Leu-Glu-Asn-Tyr-Leu-Asp-Thr-Glu-Tyr}$.

Фрагмент III дает одну полосу при электрофорезе в полиакриламидном геле при pH 9,5. C-концевая аминокислота фрагмента, определенная с помощью карбоксипептидазы А — аланин, идентична C-концевой аминокислоте пепсина. Этот факт, а также наличие во фрагменте III двух остатков аргинина, одного лизина и отсутствие гистидина позволили заключить, что фрагмент III является C-концевой частью молекулы пепсина.

С помощью автоматического метода Эдмана была установлена N-концевая последовательность выделенного фрагмента: Asn-Trp-Val-Pro-Val-Ser - Val - Glu-Gly-Tyr - Trp-Gln-Ile - Thr-Leu-Asp-Ser-Ile-Thr-Met-Asp-Gly-Glu-Thr-Ile. Анализ аминокислотной последовательности фрагмента III указывает, что его первые 20 аминокислот соответствуют C-концевому участку пептида В-2, образующегося при расщеплении свиного пепсина бромцианом [2, 3]. Следующие пять аминокислот представляют N-концевую последовательность пептида В-5, строение которого было установлено ранее [3, 4]. Эти данные позволили сделать вывод, что В-5 представляет собой часть фрагмента III. 37-членный пептид В-1 [5], занимающий в пепсине C-концевое положение, также является составной частью рассматриваемого фрагмента. В состав фрагмента III входит и пептид В-4, который, как известно [3, 6], предшествует пептиду В-1. Таким образом, полная последовательность фрагмента III с учетом данных, полученных в нашей лаборатории в последнее время, может быть представлена в следующем виде (схема 1):

Схема 1
Аминокислотная последовательность фрагмента III

180	194
Asn-Trp-Val-Pro-Val-Ser-Val-Glu-Gly-Tyr-Trp-Gln-Ile-Thr-Leu-	
	209
Asp-Ser-Ile - Thr-Met-Asp-Gly-Glu-Thr-Ile-Ala-Cys-Ser-Gly-Gly-	
	224
Cys-Gln-Ala-Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu-Leu-Thr-Gly-Pro-	
	239
Thr-Ser-Ala-Ile-Ala-Asn-Ile -Gln-Ser-Asp- Ile-Gly- Ala-Ser-Glu-	
	254
Asn-Ser-Asp-Gly-Glu-Met-Val-Ile-Ser-Cys- Ser-Ser- Ile-Asp-Ser-	
	269
Leu-Pro-Asp-Ile-Val-Phe-Thr-Ile-Asp-Gly-Val-Gln-Tyr-Pro-Leu-	
	284
Ser-Pro-Ser-Ala-Tyr-Ile-Leu-Gln-Asp-Asp-Asp-Ser-Cys-Thr-Ser-	
	299
Gly-Phe-Glu-Gly-Met-Asp-Val-Pro-Thr-Ser-Ser-Gly-Glu-Leu-Trp-	
	314
Ile-Leu-Gly-Asp-Val-Phe-Ile-Arg-Gln-Tyr-Tyr-Thr-Val-Phe-Asp-	
	326
Arg-Ala-Asn-Asn-Lys-Val-Gly-Leu-Ala-Pro-Val-Ala.	

Аминокислотный состав фрагмента хорошо согласуется с составом, рассчитанным по известной аминокислотной последовательности (см. таблицу).

Сравнивая поглощение фрагмента при 360 нм, обусловленное присутствием в нем ингибитора, и содержание единственного в молекуле пепсина остатка лизина, можно сделать вывод, что к одному молю фрагмента ковалентно присоединяется 0,75 моля ингибитора.

Следует отметить, что фрагмент III элюируется с сефадекса G-75 двумя фракциями (III-1 и III-2, рис. 2), идентичными по аминокислотному составу, N-концевой последовательности и поведению при диск-электрофорезе. Такое необычное поведение при хроматографии, вероятно, обусловлено тем, что этот фрагмент способен образовывать агрегат, который элюируется с колонки в свободном объеме (фракция III-1, рис. 2). Фракция III-2 при хроматографии ее на колонке с сефадексом G-75, калиброванной различными белками (рис. 2), ведет себя, как глобулярный белок с $M \sim 20\ 000$ и, по-видимому, представляет собой мономерный фрагмент III.

Мы полагаем, что особая устойчивость С-концевой половины молекулы свиного пепсина к протеолитической атаке, эффективно разрушающей N-концевую часть фермента, вызвана тем, что эта часть молекулы фермента представляет собой более или менее компактную пространственную структуру — своего рода «домен». В пользу такого предположения говорит и тот факт, что мономерная форма С-концевого фрагмента ведет себя при гель-фильтрации как глобула соответствующего молекулярного веса. Интересно отметить, что С-концевой фрагмент сохраняет способность пепсина к гидрофобной хроматографии. При хроматографии фрагмента III на специфических сорбентах — динитрофенилгексаметилендиамин-сефарозе и грамицидин S-сефарозе (в 0,1 н. ацетатном буфере, рН 5,0) он сорбируется подобно пепсину [7]. Для элюции фрагмента применяли 1 н.

Аминокислотный состав фрагмента III (M 18 053)

Аминокислота	Найденный в результате кислотного гидролиза		Рассчитанный по первичной структуре
	нмоль	число остатков	число остатков
Trp	Не определяли		3
Lys	23	1	1
His	Нет		Нет
Arg	50	2	2
Cys	Не определяли		4
Asp	510	20	19
Thr	290	12	11
Ser	458	18	18
Glu	338	14	12
Pro	147	6	7
Gly	361	14	14
Ala	225	9	9
Val	245	10 *	12
Met	Не определяли		3
He	287	12 *	14
Leu	229	9	8
Tyr	146	6	5
Phe	102	4	4

Всего 146

* Заниженные значения для валина и изолейцина объясняются трудностью расщепления в кислых условиях пептидных связей, образованных этими аминокислотами.

NaCl в том же буфере с 50%-ным изопропанолом, в то время как для элюции пепсина достаточно 20%-ного изопропанола в 1 н. NaCl (рН 5,0). По-видимому, пространственная структура фрагмента III менее компактна, чем структура нативного пепсина, что приводит к появлению на поверхности глобулы дополнительных гидрофобных зон сорбции и обуславливает более жесткие условия элюции фрагмента с указанных специфических сорбентов.

Во фракции IV (рис. 1), как и в III, содержится остаток ингибитора. Хроматография на сефадексе G-75 в 0,1%-ном додецилсульфате натрия при рН 6,4 привела к разделению ее на несколько фракций (рис. 3).

Анализ аминокислотной последовательности фракции IV-2 автоматическим методом Эдмана выявил, наряду с последовательностью Asp¹⁸⁰-Trp-Val-Pro-Val-Ser-Val-Glu-Gly-Tyr¹³⁹..., идентичной N-концевой последовательности фрагмента III, также присутствие последовательности Gly¹⁸⁸-Tyr-Trp-Gln-Ile... Содержание этой цепи (Gly-Tyr...) по данным автоматического метода Эдмана составляет ~ 50% по отношению к главному



компоненту Asn- (-Trp...). По данным аминокислотного анализа фракция IV-2 содержит только один остаток аргинина и не имеет лизина. С-концевая последовательность фракции IV-2 (Val-Phe) установлена с помощью карбоксипептидазы А. Очевидно, во время гидролиза происходит отщепление от С-конца молекулы ингибированного пепсина 13 аминокислот, при этом расщепляется связь Phe-Asp (схема 2), которая соответствует специфичности пепсина и, вероятно, легко доступна его атаке.

Таким образом, становится очевидно, что фракция IV-2 представляет собой смесь двух фрагментов — IV-2А и IV-2Б (схема 2), лишь незначительно отличающихся по длине полипептидной цепи.

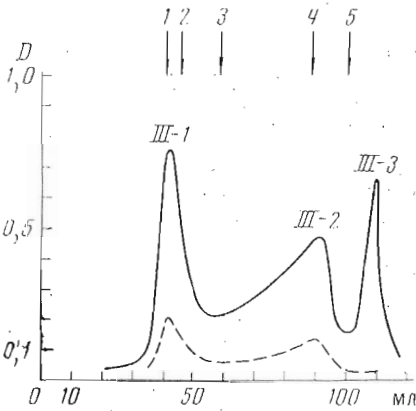


Рис. 2

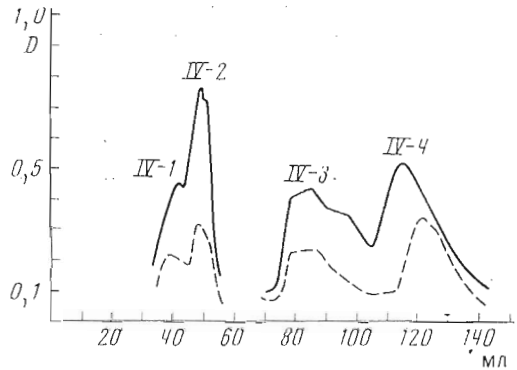


Рис. 3

Рис. 2. Хроматография фракции III на сефадексе G-75 (обозначения те же, что и на рис. 1). Стрелками отмечены объемы выхода препаратов, использованных для калибровки колонки: 1 — декстран голубой (5 000 000), 2 — яичный альбумин (45 000), 3 — пепсин свиной (34 600), 4 — химотрипсин (22 500), 5 — миоглобин лошади (17 800). В скобках указан молекулярный вес препаратов

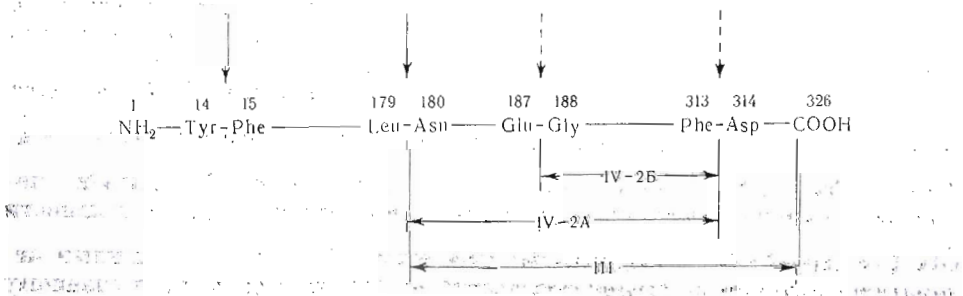
Рис. 3. Хроматография фракции IV на сефадексе G-75 (обозначения те же, что и на рис. 1). Для измерения поглощения фракций IV-1 и IV-2 аликвоты из соответствующих пробирок разбавляли в 6 раз.

Определение N-концевой последовательности фракции IV-1 на секвенаторе, а также данные аминокислотного анализа по содержанию основных аминокислот позволили сделать вывод, что указанная фракция, содержит смесь нерасщепленного пепсина и фрагментов IV-2А и IV-2Б.

Содержание фракции IV-3 недостаточно для дальнейших исследований. Фракция IV-4 не содержит пептидов и, вероятно, представляет собой продукты распада ингибитора.

Схема 2

Расщепление молекулы пепсина на пептидные фрагменты



Таким образом, в выбранных нами условиях имел место ограниченный протеолиз ингибированного пепсина нативным пепсином. Пептидный фрагмент, подвергающийся при этом атаке, находится приблизительно в середине полипептидной цепи белка и содержит в основном гидрофобные аминокислоты: ... Tyr-Tyr-Thr-Gly-Ser-Leu-¹⁴Asn-¹⁸⁰Trp-Val-Pro-Val-Ser-Val-... [4], причем преимущественное расщепление происходит по карбоксильной группе лейцина, что соответствует специфичности пепсина и также облегчает гидролиз в этом участке белковой молекулы. Образующийся N-концевой фрагмент пепсина малоустойчив и в условиях опыта быстро подвергается расщеплению. С-концевой фрагмент, по-видимому, сохраняет глобулярную структуру.

Экспериментальная часть

В работе использовали пепсин, очищенный хроматографией на DEAE-целлюлозе по методу, описанному ранее [8]. Пепсин ингибировали N-диазоацетил-N'-динитрофенилэтилендиамином в условиях, описанных Лобаревой и др. [9].

Расщепление пепсина. 200 мг ингибированного пепсина растворяли в 200 мл 0,1 н. ацетатного буфера (рН 5,1) и доводили рН раствора до 6,45 добавлением 5 н. едкого натрия. К раствору добавляли 6,6 мг нативного пепсина в 6,6 мл 0,1 н. ацетатного буфера (рН 5,1) и инкубировали смесь при 33° и рН 6,45 в течение 15 мин. По окончании реакции рН раствора доводили до 5,1 50%-ной уксусной кислотой.

Хроматография на DEAE-целлюлозе. Реакционную смесь наносили на колонку (3,0 × 20 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 0,1 н. ацетатным буфером (рН 5,1). Градиентную элюцию проводили со скоростью 24 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Для создания градиента NaCl в смеси-тель к 600 мл 0,1 н. ацетатного буфера (рН 5,1) прибавляли 1 н. раствор NaCl в том же буфере. О содержании пептидов в элюате судили по поглощению при 280 и 360 нм. Фракции собирали, обессоливали на колонках с сефадексом G-25 (мелкий), лиофилизовали. Выход фракции III 35 мг, IV—27 мг. Рехроматографию фракции III проводили в аналогичных условиях.

Хроматография фракции III на сефадексе G-75. 15 мг фракции III растворяли в 1,8 мл дистиллированной воды и наносили на колонку (1,6 × 64 см) с сефадексом G-75, промытую водой. Элюцию проводили водой со скоростью 21 мл/ч, собирая фракции по 3,5 мл.

Хроматография фракции IV на сефадексе G-75. 51 мг фракции IV растворяли в 3 мл фосфатного буфера (рН 6,4) с 0,1%-ным додецилсульфатом натрия и наносили на колонку (1,6 × 64 см) с сефадексом G-75, промытую этой же смесью, которую использовали и для элюции. Собирали фракции по 3,5 мл.

Определение аминокислотного состава пептидов. Около 0,2 мкмоль пептида помещали в ампулу, добавляли 1 мл 5,7 н. HCl, ампулу запаивали в вакууме и выдерживали 24 ч при 105°. Гидролизат упаривали на роторном испарителе и определяли состав на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi» (Япония).

Аминокислотную последовательность пептидов определяли на секвенаторе фирмы «Beckman» (США) модель 890, работавшем по белковой программе.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методике, описанной ранее для бромциановых фрагментов пепсина [10].

Авторы благодарят А. Я. Стронгина и И. А. Кузнецову (ВНИИгенетика) за выполнение диск-электрофореза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stepanov V. M. and Vaganova T. I. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **31**, 825—830.
2. Остославская В. И., Пугачева И. Б., Вахитова Э. А., Кривцов В. Ф., Муратова Г. Л., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1968) *Биохимия*, **33**, 331—337.
3. Ostoslavskaya V. I., Vakhitova E. A., Baratova L. A., Belyanova L. P., Katrunkha S. P., Kovalishin Ya. F., Lapuk Ya. I., Revina L. P., Surova I. A., Stepanov V. M., (1974) *Abstr. Commun. 9th Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, p. 342, Budapest.
4. Tang J., Sepulveda P., Marciniszyn J., Jr., Chen K. C. S., Huang W.-Y., Tao N., Liu D. and Lanier J. P., (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3437—3439.
5. Kostka V., Moravek L., Sorm F. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **13**, 447—454.
6. Moravek L., Kostka V. (1973) *FEBS Lett.*, **35**, 276—278.
7. Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Лавренова Г. И., Славинская М. М., Боровикова В. П., Адли К., Баландина Г. Н., Гончар М. М. (1974) III Всесоюзный симпозиум по химии пептидов и белков, стр. 140, Киев.
8. Левин Е. Д., Егоров Ц. А., Степанов В. М. (1965) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 825—829.
9. Stepanov V. M., Lobareva L. S., Malt'sev N. I. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **151**, 719—721.
10. Стронгин А. Я., Левин Е. Д. (1973) Всесоюзный симпозиум по химии протеолитических ферментов, стр. 29, Вильнюс.

Поступила в реакцию
24.XII.1974

LIMITED PROTEOLYSIS OF PORCINE PEPSIN

REVINA L. P., VAKHITOVA E. A., BARATOVA L. A.,
BELYANOVA L. P., STEPANOV V. M.

*All-Union Institute for Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms; Laboratory of Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The conditions for limited proteolysis of porcine pepsin (EC 3.4.4.1.) have been studied. It was found that at pH 6.45, 33° C and with enzyme to substrate ratio of 1 : 30, pepsin pre-inhibited with N-diazoacetyl-N'-2,4-dinitrophenylethylenediamine is split by active pepsin into several fragments. One of the isolated fragments contains a covalently bound residue of the diazoacetyl inhibitor. The fragment is the C-terminal half of the pepsin molecule, consists of 146 amino acids and seems to retain a globular structure. Its N-terminal sequence has been determined by the automatic Edman procedure. The suggestion was made that the C-terminal part of the pepsin molecule is a compact structure, a sort of a «domain», resistant to proteolytic attack. The N-terminal fragment of pepsin formed on proteolysis is not stable and undergoes a rapid degradation under the experimental conditions.