



УДК 577.156.41.02.578.087.1

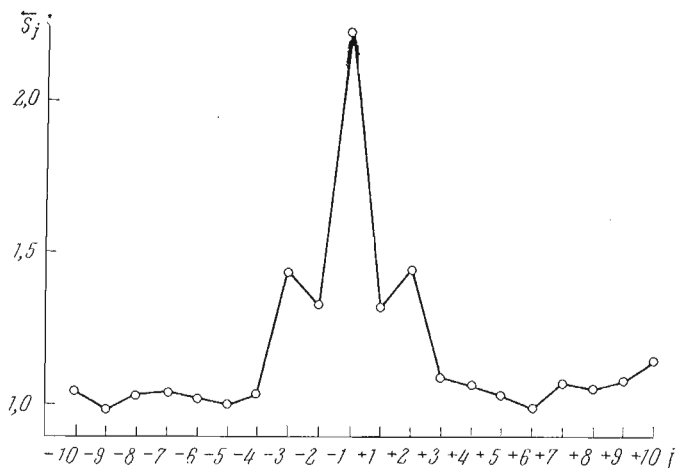
СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЕПСИНА
В ОТНОШЕНИИ ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ*Зинченко А. А., Руми Л. Д., Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Проанализированы данные по гидролизу большого числа белков и пептидов, катализируемому свиным пепсином. Установлено, что при взаимодействии субстрата с ферментом наиболее важной является последовательность остатков в пятичленном аминокислотном фрагменте расщепляемого пептида. Рассмотрены первичная и вторичная специфичности пепсина. Показано, что строение аминокислотного остатка, образующего расщепляемую связь своей карбоксильной группой, является определяющим для специфичности фермента. Наблюдается корреляция ряда специфичности остатков, образующих расщепляемую связь своей аминогруппой, со шкалой гидрофобности. Результаты статистического анализа сопоставлены с кинетическими данными по гидролизу пепсином синтетических субстратов.

Исследования специфичности свиного пепсина (КФ 3.4.23.1) в отношении синтетических низкомолекулярных субстратов, а также в отношении расщепления белков (см. обзор [1]) показали, что этот фермент катализирует главным образом гидролиз амидных связей, образованных остатками ароматических аминокислот. Однако кинетические параметры гидролиза сильно зависят от характера удаленных от расщепляемой связи аминокислотных остатков. Очевидно, существенный вклад в специфичность фермента вносят вторичные взаимодействия с этими остатками аминокислот, способствуя или препятствуя гидролизу амидной связи.

Анализ специфичности пепсина в отношении гидролиза белков был впервые проведен Тангом [2] в 1963 г. и затем Хиллом [3] в 1965 г. Основное внимание в этих работах уделялось характеристике первичной специфичности фермента. В настоящее время накопилось значительное число новых примеров расщепления белков пепсином, что позволяет составить более полную картину как первичной, так и вторичной специфичности фермента.

В данной работе мы проанализировали результаты по расщеплению пепсином различных белков: рибонуклеазы А [4], рибонуклеазы Т₁ [5] α-, β-, γ-цепей гемоглобина человека [6—8], лизоцима белка куриного яйца [9], лизоцима фага Т₄ [10], субтилизина ВРН' [11], белка вируса табачной мозаики [12], легкой цепи иммуноглобулина миеломы человека [13], α- и β-кортикотропинов [14, 15], А- и В-цепей инсулина [16, 17] и других белков [18—22], а также различных белковых фрагментов (бромциановых, трипсиновых и др.) [23—32]. Методика анализа заключалась в следующем. Для каждой расщепляемой связи рассматривали структуру пептида, содержащего 10 аминокислотных остатков в сторону N-конца от расщепляемой связи (обозначали их —1, —2, —3...) и 10 остатков в сторону C-конца



Зависимость значений \bar{S}_j от j

ца (соответственно +1, +2, +3...). При этом предполагалось, что гидролиз идет не последовательно, а независимо, т. е. в тех случаях, когда в рассматриваемый пептид, содержащий 20 остатков, входят две или более расщепляемых связей, анализировали соответственно два или более 20-членных пептидов с расщепляемыми связями, образованными аминокислотами в положениях -1 и $+1$. В 500 выделенных таким образом полипептидах была рассчитана частота встречаемости аминокислот данного типа в каждом из 20 положений пептида по формуле

$$\% A_{ij} = \frac{b_{ij}}{a_i} \cdot 100, \quad (1)$$

где a_i — общее число аминокислот данного типа во всех исследованных полипептидах; b_{ij} — число аминокислот данного типа в данном положении (j) полипептидов.

Необходимо отметить, что a_i и b_{ij} — дробные числа. Это связано с тем, что при рассмотрении коротких пептидов, коротких белковых фрагментов и в случаях, когда расщепляемая связь находилась близко от N- или C-конца молекулы белка, не удавалось выделить полные 20-членные пептиды, поэтому вводили поправочные коэффициенты $500 / a_j$ (a_j — число аминокислотных остатков в данном положении), разные для каждого (кроме -1 и $+1$) положения полипептида.

Полагая, что частоты встречаемости аминокислот разного типа в данном положении при отсутствии какой-либо специфичности в связывании субстрата ферментом должны различаться незначительно, вычисляли среднюю частоту встречаемости аминокислот в данном положении $\% \bar{A}_j$.

$$\% \bar{A}_j = \sum_{i=0}^{20} \% A_{ij} / 20. \quad (2)$$

Отношение этих величин

$$k_{ij} = \frac{\% A_{ij}}{\% \bar{A}_j} \quad (3)$$

характеризовало отклонение от среднего распределения аминокислотных остатков для данного положения.

Границы доверительных интервалов для значений k_{ij} данного типа аминокислот рассчитывали по формуле

$$\Delta x_i = \varepsilon \sigma, \quad (4)$$

где $\sigma \cong S_n$ — среднеквадратичное отклонение k_{ij} от единицы; $\varepsilon = 2$ для вероятности $\alpha = 0,95$.

В результате получили значения верхней и нижней границ доверительных интервалов для k_{ij} аминокислот каждого типа соответственно:

$$1 + \Delta x_i \text{ и } 1 - \Delta x_i. \quad (5)$$

Характеристикой предпочтительности аминокислоты данного типа в данном положении считали

$$S_{ij} = \frac{k_{ij}}{1 + \Delta x_i} \text{ для } k_{ij} \geq 1$$

и

$$S_{ij} = -\frac{1 - \Delta x_i}{k_{ij}} \text{ для } k_{ij} < 1. \quad (6)$$

Предпочтительными для данного положения считали остатки аминокислот, для которых $S_{ij} \geq +1$; нежелательными — такие, для которых $S_{ij} \leq -1$. Аминокислотные остатки с $+1 > S_{ij} > -1$ считали индифферентными.

В качестве примера приведем расчеты для остатка изолейцина в положениях -1 и $+1$. В исследованных пептидах встретилось 372,3 остатка изолейцина, из них в положении -1 три остатка, в положении $+1$ — 31.

Согласно формуле (1),

$$\% A_{Ile, -1} = 0,81, \quad \% A_{Ile, +1} = 8,33.$$

По формуле (2) считали среднюю частоту встречаемости аминокислот в положениях -1 и $+1$

$$\% \bar{A}_{-1} = 4,99, \quad \% \bar{A}_{+1} = 5,13;$$

отсюда по формуле (3)

$$k_{Ile, -1} = 0,16, \quad k_{Ile, +1} = 1,62.$$

Верхняя граница доверительного интервала для изолейцина равна 1,16, нижняя — 0,84 (см. формулы (5)).

Таким образом, по формулам (6) имеем

$$S_{Ile, -1} = -5,25 \text{ и } S_{Ile, +1} = +1,40,$$

т. е. в положении -1 изолейцин явно нежелателен, в положении $+1$ это предпочтительная аминокислота.

Представляется интересной зависимость \bar{S}_j от j , где

$$\bar{S}_j = \sum_{i=0}^{20} |S_{ij}| / 20,$$

для S_{ij} взяты абсолютные значения; j — положение аминокислотных остатков по отношению к расщепляемой связи (см. рисунок). Эта зависимость, видимо, отражает «жесткость» требований различных участков связывающей зоны фермента к структуре аминокислотных остатков субстрата. На общем фоне равномерного распределения \bar{S}_j по положениям выделяются значения в интервале $-3 \div +2$. Очевидно, область фермента, соответствующая этому интервалу в пептиде, наиболее существенна для взаимодействия субстрата с ферментом. Наибольшее значение ($\bar{S}_j = 2,22$) приходится на положение -1 . Видимо, тип аминокислотного остатка в этом положении является определяющим при расщеплении субстрата пепсином. Аналогичный вывод следует из рассмотрения значений S_{ij} (табл. 1). Для положения -1 спектр значений S_{ij} весьма широк: от $+2,46$ для лейцина, наиболее предпочтительной аминокислоты, до $-6,23$ для аргинина, наиболее нежелательной в этом положении аминокислоты (остаток пролина абсолютно нежелателен в этом положении и ни разу здесь не встречается). В то же время в положении $+1$ интервал значений S_{ij} существенно уже: от $+1,52$ для триптофана и тирозина до $-2,3$ для треонина.

Значения S_{ij} для положений от -5 до $+5$ *

$i \backslash j$	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Gly	+1,23	+1,02	+1,45	-1,17	-1,52	-1,82	-1,15	-1,63	+1,26	+1,12
Ala	-0,99	-1,16	+1,27	+1,36	+1,15	+1,08	+1,33	-1,00	-1,13	+1,05
Val	+0,95	-1,00	+1,11	+1,24	-1,95	+1,16	+1,14	-1,12	-1,19	-1,30
Leu	+0,92	+0,90	-0,97	-1,58	+2,46	+1,09	-1,09	+1,20	-1,13	-1,45
Ile	-1,22	+1,00	+1,29	-0,88	-5,25	+1,40	+1,34	-0,97	+0,86	+1,17
Ser	+1,19	-0,98	+1,53	+1,18	-2,51	-1,37	+0,94	-1,08	+1,08	+1,07
Thr	-1,08	-1,01	+1,34	-1,03	-1,32	-2,31	+1,36	+0,95	-1,08	-0,96
Met	+0,78	-1,23	-2,16	+0,91	+1,16	-1,29	-1,23	+0,97	+0,75	-0,61
Cys	-1,08	+0,94	+0,85	-0,84	-3,55	-1,03	+1,42	+1,21	-0,85	-0,95
Pro	+1,18	+1,25	+1,45	-1,43	$-\infty$	-1,43	-1,89	-1,08	+1,06	+1,31
Phe	-0,95	+0,99	-2,03	-1,43	+2,28	+1,39	-5,13	-1,22	+1,03	-0,92
Tyr	+0,97	+1,37	+0,88	-3,04	-1,04	+1,52	-1,37	-1,18	-1,08	+0,95
Try	-0,74	-1,27	-1,70	-1,27	+1,67	+1,52	-0,64	+1,02	-0,97	+0,92
His	+0,97	-0,80	-1,78	-0,89	-1,66	-0,95	-1,33	+1,12	+1,21	+0,80
Lys	+0,88	+0,97	-2,90	-1,32	-3,48	+0,92	+0,93	+0,96	+1,43	+0,91
Arg	-0,86	+0,87	-1,72	+1,24	-6,23	-1,37	+1,45	-0,91	-0,98	-0,88
Asp	+1,11	+1,04	+0,96	-1,17	+1,04	+1,04	-1,69	-1,21	-1,07	-0,96
Asn	-1,14	-0,98	+1,05	+1,70	-1,10	-1,25	-0,98	+0,93	-1,02	-1,05
Glu	-1,06	-1,10	+1,25	+1,63	+1,49	-1,16	+1,29	-1,14	-1,00	-0,98
Gln	-0,92	-0,91	-0,98	+1,14	+1,19	-1,09	+1,08	+0,95	-1,02	-1,16

* Жирным шрифтом обозначены $S_{ij} > +1$ (соответствует предпочтительным аминокислотным остаткам в данном положении); курсивом $-S_{ij} < -1$ (соответствует нежелательным аминокислотным остаткам в данном положении); обычным шрифтом $+1 > S_{ij} > -1$ (соответствует индифферентным аминокислотным остаткам в данном положении).

Рассмотрим требования, предъявляемые ферментом к характеру аминокислотных остатков в положениях -1 и $+1$, т. е. первичную специфичность пепсина (см. табл. 1 и 2). Как уже отмечалось, требования эти довольно жесткие: в положении -1 индифферентных остатков нет вообще, в положении $+1$ их всего два. Наиболее предпочтительными остатками в положении -1 являются лейцин, фенилаланин, триптофан и глутаминовая кислота. Весьма нежелательны здесь аргинин, изолейцин, цистеин, лизин, серин, валин, гистидин и глицин. (Необходимо, однако, отметить, что данные для цистеина вряд ли корректны, ибо в разных белках этот остаток находился в различных формах в зависимости от способа денатурации гидролизуемого белка.) Очевидно, что боковая цепь аминокислотных остатков в этом положении не должна содержать разветвлений при β -С-атоме и не должна быть положительно заряженной.

Если сравнивать ряд аминокислотных остатков, предпочтительных в положении $+1$, со шкалой гидрофобности [33], легко заметить между ними весьма удовлетворительную корреляцию. Отсюда можно заключить, что гидрофобные взаимодействия в этом положении играют определяющую роль. Для положения -1 такой корреляции не наблюдается.

Имея результаты статистической обработки, интересно обратиться к исходным данным по гидролизу белков пепсином. Оказывается, что из

Таблица 2

Значения S_{ij} для наиболее предпочтительных и наиболее нежелательных аминокислотных остатков в положениях —5÷+5

-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Gly +1,23	Trp +1,37 Pro +1,25	Ser +1,53 Pro +1,45 Gly +1,45 Thr +1,34 Ile +1,29 Ala +1,27 Glu +1,25	Asn +1,70 Glu +1,63 Ala +1,36 Val +1,24 Arg +1,24	Leu +2,46 Phe +2,28 Trp +1,67 Glu +1,49	Trp +1,52 Tyr +1,52 Ile +1,40 Phe +1,39	Arg +1,45 Cys +1,42 Thr +1,36 Ile +1,34 Ala +1,33 Glu +1,29	Cys +1,21 Leu +1,20	Lys +1,43 Gly +1,26 His +1,21	Pro +1,31
Ile -1,22	Met -1,23 Trp -1,27	Trp -1,70 Arg -1,72 His -1,78 Phe -2,03 Met -2,16 Lys -2,90	Trp -1,27 Lys -1,32 Phe -1,43 Pro -1,43 Ile -1,58 Tyr -3,04	Thr -1,32 Gly -1,52 His -1,66 Val -1,95 Ser -2,51 Lys -3,48 Cys -3,55 Ile -5,25 Arg -6,23	Asn -1,25 Met -1,29 Arg -1,37 Ser -1,37 Pro -1,43 Gly -1,82 Thr -2,31	Met -1,23 His -1,33 Tyr -1,37 Asp -1,69 Pro -1,89 Phe -5,15	Met -1,23 His -1,33 Tyr -1,37 Asp -1,21 Phe -1,22 Gly -1,63		Val -1,30 Leu -1,45

500 гидролизующих связей 469 (93,7%) содержат хотя бы один аминокислотный остаток с $S_{ij} > 1$ в положениях -1 и $+1$. Из них 213 (~45,4%) связей содержат остатки с $S_{ij} > 1$ в положениях -1 и $+1$, 153 (~32,6%) связи составлены из остатков с $S_{ij} > 1$ в положении -1 и 103 (~22%) — в положении $+1$. Оставшаяся 31 связь (~6,3%) не содержит ни одной аминокислоты с $S_{ij} > 1$ ни в одном из этих положений, из них 29 (~93, 6% от оставшейся 31 связи) образованы аминокислотными остатками с $S_{ij} < -1$. Таким образом, даже если предположить, что наличие наиболее предпочтительных аминокислотных остатков в положениях -1 и $+1$ (см. табл. 2) является достаточным условием расщепления пептидной связи на ферменте, поведение пепсина нельзя объяснить только с точки зрения первичной специфичности.

При обсуждении вторичной специфичности (табл. 1) мы ограничились областью $-5 \div +5$, ибо трудно предположить, что для связывания субстрата на ферменте существенны все 20 рассмотренных нами положений. Анализ данных показывает, что требования к структуре субстратов при переходе от близких к расщепляемой связи остатков к более удаленным имеют тенденцию к снижению. Число индифферентных остатков в положениях -2 и $+2$ — по четыре, в положениях -3 и $+3$ — пять и семь соответственно, в положениях -5 и $+5$ — по 11 аминокислотных остатков. Та же тенденция наблюдается и для изменения S_{ij} — сужение интервалов с удалением от расщепляемой связи. Гидрофобные взаимодействия в положениях -3 , -2 и $+2$, видимо, играют важную роль. Из 12 типов аминокислотных остатков, встречающихся в этих положениях, — шесть гидрофобных, однако остатки, возглавляющие ряд гидрофобности «триптофан, тирозин, фенилаланин, лейцин» здесь относятся в лучшем случае к индифферентным остаткам. Вероятно, это результат высокого родства их к ферменту в положениях -1 и $+1$. В этой группе интересно положение -3 . Все положительно заряженные аминокислотные остатки относятся к явно нежелательным, тогда как остаток глутаминовой кислоты предпочтителен. Возможно, здесь имеют место электростатические взаимодействия. В положении $+2$ наиболее предпочтительным остатком является аргинин, но к этой же группе принадлежит и остаток глутаминовой кислоты.

В оставшихся пяти положениях среди предпочтительных встречаются все гидрофобные остатки, кроме валина. Привлекают внимание довольно выраженной нежелательностью остатков валина и лейцина в положении $+5$ и предпочтительностью остатков лизина и гистидина в положении $+4$.

Интересно сопоставить результаты статистического анализа с данными по гидролизу синтетических субстратов. Поскольку статистический анализ не учитывает скоростей расщепления разного типа связей, нельзя ожидать количественной корреляции с данными по гидролизу синтетических субстратов, однако качественное соответствие между ними есть, и довольно хорошее. Из литературных данных по гидролизу субстратов типа Z-His-Phe-X-OMe и Z-His-X-Phe-OMe [34] можно составить следующий ряд специфичности для положения -1 : Phe, Trp, Leu, Tyr, Met, Ala, Gly; для положения $+1$: Trp, Tyr, Phe, Ile, Met, Leu, Ala, Gly.

К сожалению, из литературных данных нельзя составить полного ряда специфичности, но даже приведенные аминокислотные остатки свидетельствуют о хорошем совпадении с результатами статистического анализа. Соединения Z-His-Val-Phe-OMe и Z-His-Ile-Phe-OMe пепсином не расщепляются, что вполне соответствует нашим данным.

Соединения типа A-Ala-Ala-B, видимо, расщепляются только при наличии благоприятных вторичных взаимодействий. Несколько неожиданным казался тот факт, что тирозин в положении -1 попал в разряд нежелательных аминокислотных остатков. Однако сравнение каталитических констант пар соединений Ac-Phe-Phe-OMe и Ac-Tyr-Phe-OMe [34] с Z-His-Tyr-Tyr-OEt и Z-His-Phe-Tyr-OEt [35] показывает, что отношение

$k_{\text{кат}}/K_m$ для соединений с тирозином в положении -1 в 15—20 раз ниже, чем для соответствующих соединений с остатком фенилаланина в этом положении.

Необходимо отметить, что сравнивать специфичность аминокислотных остатков следует только для одинаковых положений по отношению к расщепляемой связи. Так, субстрат типа А-Трп-Фе-В должен хуже расщепляться пепсином, чем субстрат типа А-Фе-Трп-В, так как $S_{\text{Трп},-1} + S_{\text{Фе},+1} = +3,06$, а $S_{\text{Фе},-1} + S_{\text{Трп},+1} = +3,80$. Это подтверждается и на синтетических субстратах при сравнении отношений $k_{\text{кат}}/K_m$ для Z-His-Трп-Фе-ОМе ($\sim 0,052 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$) и для Z-His-Фе-Трп-ОМе ($\sim 2,25 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$) [34].

Довольно хорошее соответствие данных статистического анализа и скоростей гидролиза синтетических субстратов наблюдается и для вторичной специфичности, хотя в последнем случае сравнивать результаты существенно труднее, поскольку вторичная специфичность изучалась только для субстратов типа А-Фе-Фе-В. Естественно, что здесь возможны несоответствия. Так, согласно нашим данным, остаток лейцина в положении -2 выраженно нежелателен ($S_{ij} = -1,58$), но замена предпочтительного в этом положении остатка аланина в субстрате типа Z-Gly-Ala-Фе-Фе-ОР4Р [36] на остаток лейцина приводит даже к некоторому улучшению субстрата, отношение $k_{\text{кат}}/K_m$ увеличивается в 1,1 раза, а замена на остаток гистидина, нейтральный в этом положении, ухудшает отношение $k_{\text{кат}}/K_m$ более чем на два порядка. Таким образом, остаток лейцина оказывается в синтетических субстратах более предпочтительным, чем гистидин, а в белках — менее предпочтительным. Такого рода исключения, видимо, можно объяснить большей конформационной подвижностью аминокислотных остатков в малых пептидах по сравнению с их подвижностью в больших фрагментах белковых молекул.

С другой стороны, замена в том же пептиде остатка аланина на пролин, являющийся, по нашим данным, нежелательным, приводит к падению величины $k_{\text{кат}}/K_m$ почти на четыре порядка.

Как уже упоминалось, среди рассмотренных последовательностей имеется небольшое число ($\sim 6\%$) пептидов, расщепляемая связь которых образовала остатками аминокислот с $S_{ij} < +1$. Значительное число таких пептидов ($\sim 50\%$) имеет четко выраженные предпочтительные аминокислотные остатки в положениях -3 , -2 и $+2$, причем это особенно справедливо для положения -3 , в котором все остатки имеют $S_{ij} > -1$. Ряд последовательностей все же отклоняется от этого правила. Причины расщепления амидной связи в таких последовательностях неясны. Не исключено, что в ряде случаев при длительной инкубации белка с пепсином в кислой среде происходил неспецифический кислотный гидролиз некоторых связей.

Наконец, трудно объяснить устойчивость к пепсиному гидролизу ряда пептидов (7 случаев), образованных остатками предпочтительных для фермента аминокислот, например -Val-Gly-Ile-Met-Фе-Tyr-Leu-Pro-Gly-Asp [28]. Возможно, что эти случаи обусловлены особенностями третичной структуры денатурированного белка или растворимостью образующихся при гидролизе фрагментов. Так или иначе, все случаи, не согласующиеся с выводами статистического анализа, составляют малую долю от общего числа проанализированных последовательностей и являются скорее исключением, чем правилом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fruton J. S. (1970) *Advances enzymol. and related subjects biochem.*, 33, 401—443.
2. Tang J. (1963) *Nature*, 199, 1094—1095.
3. Hill R. L. (1965) *Advances Protein Chem.*, 20, 37—107.
4. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H. (1960) *J. Biol. Chem.*, 235, 633—647.
5. Takahashi K. (1971) *J. Biochem.*, 70, 803—815.

6. Konigsberg W., Hill R. J. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 3157—3162.
7. Konigsberg W., Goldstein J., Hill R. J. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2028—2033.
8. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J., Jones R. T. (1963) *Biochemistry*, **2**, 992—1008.
9. Canfield R. E. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2698—2707.
10. Inouye M., Imada M., Tsugita A. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 3479—3484.
11. Markland F. S., Rubadeau-Dumas B., Smith E. L. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5174—5197.
12. Anderer F. A., Uhlig H., Weber E., Schramm G. (1960) *Nature*, **186**, 922—925.
13. Milstein C. P., Deverson E. V. (1971) *Biochem. J.*, **123**, 945—958.
14. Li C. H., Geschwind I. I., Cole R. D., Raacke I. D., Harris J. I., Dixon J. S. (1955) *Nature*, **176**, 687—689.
15. Howard K. S., Shepherd R. G., Eigner E. A., Davis D. S., Bell P. H. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3419—3420.
16. Sanger F., Tuppy H. (1951) *Biochem. J.*, **49**, 481—490.
17. Sanger F., Thompson E. O. P. (1953) *Biochem. J.*, **53**, 366—374.
18. Li C. H., Dixon J. S., Wan Kyng Liu (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **133**, 70—91.
19. Asbeck F., Beyreuther K., Kohler H., Wettstein G., Braunitzer G. (1969) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **350**, 1047—1066.
20. Vanaman T. C., Wakil S. J., Hill R. L. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 6420—6431.
21. Wan Kyng Liu, Nahm H. S., Sweeney C. M., Holcomb G. N., Ward D. N. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4365—4381.
22. Nolan C., Margoliash E., Peterson J. D., Steiner D. F. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 2780—2895.
23. Best J. S., Flamm U., Braunitzer G. (1969) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **350**, 563—580.
24. Nishihara T., Nozu Y., Okada Y. (1970) *J. Biochem.*, **67**, 403—413.
25. Brew K., Castellino F. J., Vanaman T. C., Hill R. L. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 4570—4582.
26. Weber K., Konigsberg W. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3563—3578.
27. Cunnigham B. A., Rutishauser U., Gall W. E., Gottlieb P. D., Waxdal M. J., Edelman G. M. (1970) *Biochemistry*, **9**, 3161—3170.
28. Hilse K., Braunitzer G. (1968) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **349**, 433—450.
29. Langer B., Steinmetz-Kayne M., Hilschmann N. (1968) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **349**, 945—951.
30. Bradshaw R. A., Walsh K. A., Neurath H. (1971) *Biochemistry*, **10**, 961—971.
31. Dautrevaux M., Boulanger Y., Han K., Biserte G. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **11**, 267—277.
32. Hilschmann N. (1968) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **348**, 1077—1080.
33. Tanford C. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4240—4247.
34. Clement G. E. (1973) *Progress Bioorg. Chem.*, **2**, 177—238.
35. Inoye K., Voynick I. M., Delpierre G. R., Fruton J. S. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2473—2483.
36. Sachdev G. P., Fruton J. S. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4465—4470.

Поступила в редакцию
17.X.1975

STATISTICAL ANALYSIS OF THE PEPSIN SPECIFICITY IN HYDROLYSIS OF PROTEINS

ZINCHENKO A. A., RUMSH L. D., ANTONOV V. K.

*I. M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The data on the porcine pepsin catalyzed hydrolysis of a variety of proteins and peptides have been analyzed. It was demonstrated that the most important for the enzyme-substrate interaction is the sequence of five-membered peptide around the bond to be broken. The performed analysis took into consideration both primary and secondary specificities of pepsin. The structure of the amino acid residue which forms the susceptible bond by its carboxyl group was shown to determine pepsin specificity. A correlation was found between the specificity rank of the residues forming the susceptible bond by their amino group and the hydrophobicity scale. The results are compared with the kinetic data on the pepsin catalyzed hydrolysis of synthetic substrates.