



УДК 577.152.342*21

© 1994 Г. Н. Руденская

НОВЫЕ ПОДСЕМЕЙСТВА СУБТИЛИЗИНОВ

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

Ключевые слова: протеиназы сериновые, субтилизины, новые подсемейства.

Обзор посвящен обсуждению новых данных о сериновых протеиназах, принадлежащих к семейству субтилизинов. Рассмотрены следующие подсемейства субтилизинов: тиолзависимые сериновые протеиназы, внутриклеточные сериновые протеиназы бацилл, а также субтилизиноподобные протеиназы из различных таксономических групп — архебактерий, грибов, дрожжей, растений, животных.

Сериновые эндопептидазы — хорошо изученный класс протеолитических ферментов, включающий в себя по меньшей мере два семейства эволюционно родственных ферментов: химотрипсина (КФ 3.4.21.1) и субтилизины (КФ 3.4.21.62). Указанные семейства весьма обширны и объединяют протеиназы со значительно различающимися свойствами. Настоящее сообщение посвящено сравнительной характеристике некоторых групп сериновых протеиназ семейства субтилизинов, изученных в лабораториях химии белка химического факультета МГУ и ВНИИ генетики, а также в других лабораториях в нашей стране и за рубежом.

К типичным субтилизином относят ферменты микробного происхождения, такие, как субтилизин BPN' из *Bacillus amyloliquefaciens* [1, 2], субтилизин Карлсберг из *B. licheniformis* [3, 4] и их аналоги из других микроорганизмов. Для этих протеиназ известны последовательности аминокислот, проведен рентгеноструктурный анализ. Субтилизины бацилл — это секреторные ферменты с молекулярными массами порядка 28 000 Да, изоэлектрическими точками выше pH 8, устойчивые и активные в щелочной области pH. Субтилизины обладают широкой субстратной специфичностью, но предпочтительно расщепляют связи, образованные гидрофобными аминокислотами. В аминокислотном составе молекулы преобладают гидрофобные аминокислоты и полностью отсутствуют цистин и цистеин.

В последнее время из архебактерий, грибов, дрожжей, растений и даже из животных было выделено и исследовано большое число субтилизиноподобных протеиназ, отличающихся по ряду свойств от типичных субтилизинов бацилл. Наиболее надежный способ доказательства принадлежности этих ферментов к семейству субтилизинов — установление сходства их первичных структур. Попытка систематизировать субтилизиноподобные ферменты по степени их структурного сходства с типичными субтилизином была предпринята Р. Сизеном с

Список сокращений: DFP — диизопропилфторфосфат, PMSF — фенолметилсульфонилфторид, РСМВ — *n*-хлормеркурибензоат.

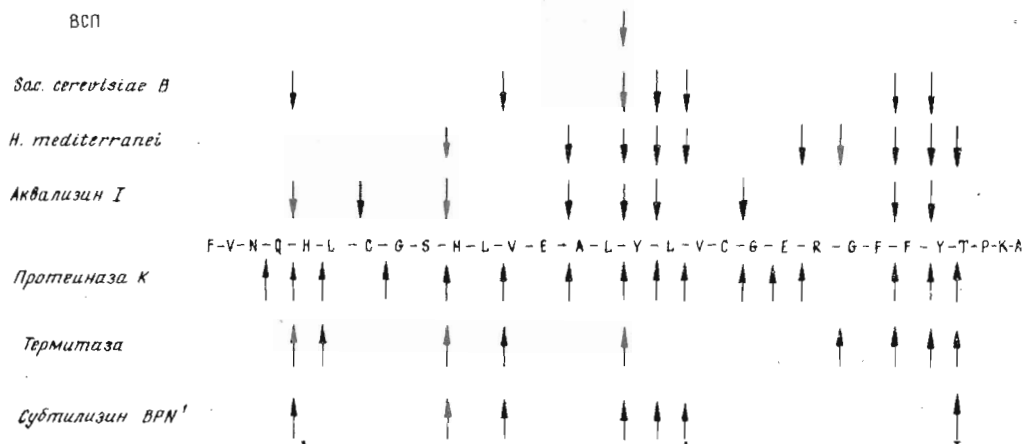


Рис. 1. Специфичность субтилизинов микроорганизмов по расщеплению окисленной В-цепи инсулина соавт. [5]. В результате сравнения 50 известных первичных аминокислотных последовательностей субтилизиноподобных ферментов авторы предложили деление «субтилаз» на два класса и ряд подклассов. Однако при таком подходе не учитываются функциональные особенности ферментов из разных источников. Цель настоящей работы — показать многообразие и широкую распространенность субтилизинов у прокариотических и эукариотических организмов, особенности субтилизинов, выделенных из различных таксономических групп.

1. Субтилизиноподобные тиолзависимые сериновые протеиназы бацилл

Тиолзависимые сериновые протеиназы в отличие от обычных субтилизинов содержат цистеин, блокирование сульфгидрильной группы которого инактивирует фермент. Они ингибируются как типичными ингибиторами сериновых протеиназ (например, DFP и PMSF), так и ртутьсодержащими реагентами на SH-группу (PCMB и $HgCl_2$). Фермент такого типа был выделен нами из *Thermoactinomyces vulgaris* ИНМИ-4А [6] хроматографией на сорбентах с бацитрацином в качестве лиганда; из другого штамма *Th. vulgaris* была выделена протеиназа, названная термитазой [7]. Оказалось, что эти ферменты весьма сходны. Для выяснения роли сульфгидрильной группы в катализе и взаимного влияния функциональных групп активного центра протеиназы *Th. vulgaris* ИНМИ-4А было изучено действие на нее ряда ингибиторов [8]. Показано, что модификация фермента PMSF замедляет, а Z-Ala-Val- CH_2Cl блокирует модификацию цистеина объемистым PCMB, но практически не сказывается на его модификации ионами ртути. Модификация SH-группы значительно замедляет, но не предотвращает модификацию активного серина PMSF и гистидина высокоспецифичными хлорметилкетонами. Активность фермента полностью восстанавливалась после обработки меркаптоэтанолом. Аналогичные результаты были получены и для термитазы [9].

Тиолзависимые сериновые протеиназы обнаружены также у некоторых бацилл и стрептомицетов — *B. thuringiensis* [10], *B. cereus* [11], *Str. rectus* [12], *Str. thermovulgaris* [13]. Тиолзависимые сериновые протеиназы, как и все субтилизины, обладают широкой субстратной специфичностью, эффективно гидролизуют связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот лейцина, фенилаланина, тирозина (рис. 1). Исследованные ферменты имеют сходный аминокислотный состав, выраженную гомологию N-концевых последовательностей, отличающихся от N-концевых последовательностей типичных субтилизинов.

Как показали рентгеноструктурные исследования термитазы [14], N-концевой фрагмент термитазы образует большое количество контактов с Ca^{2+} -связывающей петлей фермента за счет остатков Asp⁵ и Gln¹². Включение дополнительной заряженной группы в координационную сферу Ca^{2+} и наблюдаемые взаимодействия вокруг него свидетельствуют о стабилизирующей роли N-концевого фрагмента в связывании иона кальция термитазой и, возможно, родственными ей ферментами.

Сравнение структуры термитазы [15] со структурой субтилизина Карлсберг [16] показывает значительную гомологию, причем она особенно четко выражена у фрагментов, включающих в себя функциональные группы активного центра. Цистеин, важный для активности фермента, располагается в непосредственной близости к гистидину, принимающему участие в каталитическом акте. С помощью рентгеноструктурного анализа было показано, что расстояние от S^γ Cys⁷⁵ до O^γ Ser²²⁵ (3,51 Å) благоприятно для образования водородной связи [14]. На основании вышеуказанных особенностей можно выделить тиолзависимые сериновые протеиназы в особое подсемейство субтилизиноподобных протеиназ [17].

2. Субтилизиноподобные протеиназы архебактерий

Архебактерии возникли на ранних этапах эволюции и, видимо, развивались обособленно от зубактерий, растений и животных. Многие архебактерии в процессе эволюции адаптировались к существованию в экстремальных условиях: при повышенных температуре, кислотности, концентрации солей. В настоящее время известны протеиназы *Halobacterium halobium* [18], *Thermus aquaticus* YT-120 [19], архебактерии 172 PI (галолизин) [20, 21], а также изученная нами протеиназа *H. mediterranei* [22, 23]. Фермент *H. mediterranei* активен только в растворах с высокой ионной силой (не менее 4 М NaCl), заметно инактивируется в присутствии органических растворителей. Молекулярная масса его значительно больше, чем у субтилизинов бацилл и грибов, и близка к величинам M_r , найденным для протеиназы *H. halobium* и галолизина. Для последнего определена полная первичная структура по гену [21].

Сравнение первичных структур галолизина и термитазы показало, что у них в 130 положениях находятся идентичные аминокислоты (у галолизина и субтилизина BPN' — в 103 положениях). Однако в отличие от других субтилизинов галолизин имеет длинную C-концевую последовательность (около 120 аминокислотных остатков), образованную преимущественно гидрофильными аминокислотами. Протеиназа *H. mediterranei* полностью ингибируется DFP и PMSF, под действием PCMB и Hg²⁺ активность ее снижается. В составе молекулы много дикарбоновых аминокислот и их амидов, присутствие которых способствует удержанию воды белком в среде с высокой концентрацией соли. Нами определена N-концевая последовательность (18 аминокислот), которая оказалась гомологичной N-концевой последовательности сериновой тиолзависимой протеиназы из *Th. vulgaris* (50%) и галолизину (60%). У рассматриваемых протеиназ выраженная гомология имеется также в структуре фрагмента активного центра вблизи Asp³⁵ (Asp³² у субтилизина BPN'). При исследовании специфичности протеиназы *H. mediterranei* по расщеплению B-цепи инсулина (рис. 1) было установлено, что при низкой концентрации соли фермент гидролизует связи Leu¹⁵-Val¹⁶, Phe²⁵-Val²⁶. В 4,5 М NaCl гидролиз приводит к появлению многочисленных пептидных фрагментов, что указывает на широкую субстратную специфичность протеиназы архебактерий, сравнимую со специфичностью субтилизиноподобной протеиназы K из гриба *Tritirachium album* [24]. Отличительная особенность фермента *H. mediterranei* — способность гидролизовать связи, образованные как основными, так и дикарбоновыми аминокислотами. Вероятно, для протеиназы, приспособленной к проявлению ферментативной активности в растворах с высокой ионной силой, заряд субстрата, в том числе заряд остатка в положении P₁, не

является определяющим. Таким образом, впервые показано, что фермент гало-бактерии, сериновая протеиназа *H. mediterranei*, относящаяся к царству археобактерий, — это гомолог субтилизиноподобных протеиназ эубактерий.

3. Субтилизиноподобные протеиназы грибов

С помощью аффинной хроматографии на бацитрацинсодержащих сорбентах нами были выделены субтилизиноподобные сериновые протеиназы из *Trichoderma lignorum* и *T. koningii* [25], а также *Acremonium chrysogenum* [26—28]. Полученные ферменты характеризуются рН-оптимумом действия в щелочной среде, устойчивостью в широких пределах рН и температуры; по аминокислотному составу и ряду свойств они больше похожи на протеиназу К [24], чем на типичные субтилизины бацилл. Эти ферменты содержат цистин и цистеин, однако в отличие от тиолзависимых сериновых протеиназ практически не ингибируются соединениями ртути. N-Концевые участки протеиназ I и II из *Acr. chrysogenum* проявляют выраженную гомологию (из 15 аминокислотных остатков 9 идентичны) между собой и заметно отличаются от N-концевых участков субтилизинов бацилл. В то же время имеется гомология с протеиназой К [29], а также с субтилизиноподобными протеиназами *Asp. oryzae* [30] и *Str. rutgersensis* SRPD [31].

Приведенные данные свидетельствуют о существовании подгруппы субтилизиноподобных протеиназ грибов. В классификации «субтилаз» [5] протеиназа К и рассмотренные выше в этом разделе ферменты входят в особый подкласс II структурно родственных субтилаз. Термитаза по этой классификации попадает в другой подкласс — I — S. Однако пространственные структуры термитазы и протеиназы К весьма сходны [32], особенно в районе активного центра.

4. Внутриклеточные субтилизины бацилл

Гомогенные внутриклеточные сериновые протеиназы (ВСП) были выделены сначала из клеток *B. amyloliquefaciens* A-50, а затем и из ряда других видов бацилл [33]. Эти близкородственные ферменты существенно отличаются от секреторных субтилизинов тех же видов. Будучи сериновыми протеиназами, все ВСП ингибируются DFP и PMSF, а также полностью инактивируются EDTA и EGTA — комплексонами для ионов Ca^{2+} . Молекулярная масса этих ферментов вдвое больше молекулярной массы известных секреторных субтилизинов бацилл. В работе [33] показано, что ВСП функционируют в виде димеров. ВСП не дают реакции преципитации с антисыворотками к соответствующим внеклеточным субтилизинам. Аминокислотный состав ВСП характеризуется повышенным уровнем дикарбоновых аминокислот и содержанием остатка цистеина. В настоящее время установлена первичная структура фермента *B. amyloliquefaciens* ВСП_{Bam} [34], которая гомологична структуре субтилизина BPN' (40%) и ВСП из *B. subtilis* (ВСП_{Bsu} IF03013) [35]. Структура последнего фермента определена по структуре гена. Участки последовательности, содержащие аминокислоты активного центра Asp³², His⁶⁴, Ser²²⁶ (по нумерации субтилизина BPN'), высокогомологичны или полностью совпадают у трех сравниваемых ферментов. ВСП_{Bam} — цитоплазматический фермент, на цитоплазматическую фракцию клеток приходится не менее 80% общей активности протеиназы. Субстратная специфичность ВСП уже специфичности секреторных субтилизинов. Так, если субтилизин BPN' гидролизует в В-цепи окисленного инсулина пять пептидных связей, то в сравнимых условиях ВСП гидролизуют лишь одну пептидную связь — Leu¹⁵-Tyr¹⁶ [36]. ВСП проявляют высокую активность по отношению к низкомолекулярным синтетическим субстратам и низкую к нативным белкам. Следует отметить, что субтилизин BPN' гидролизует нативные белки существенно глубже, чем ВСП, в то же время денатурированную рибонуклеазу и бычий сывороточный альбумин рассматриваемые протеиназы гидролизуют со сравнимой скоростью. По мнению авторов [36], димеризация может рассматриваться как функциональная особен-

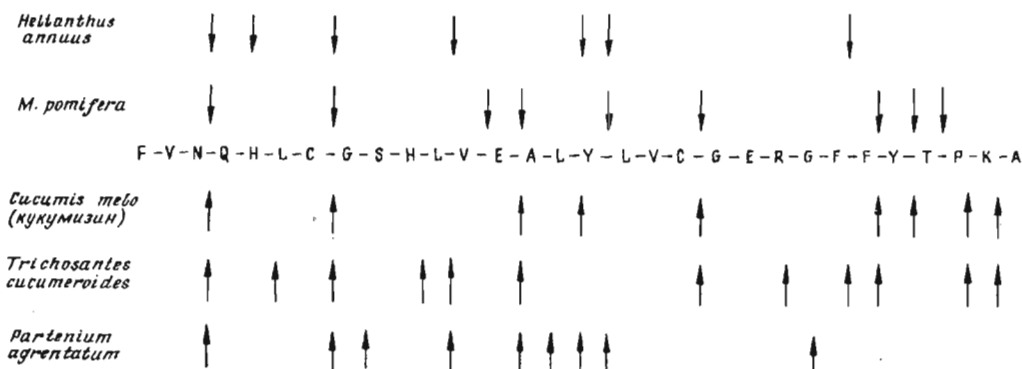


Рис. 2. Специфичность субтилизинов растений по расщеплению окисленной В-цепи инсулина

ность внутриклеточного фермента, защищающая нативные белки от случайного протеолиза *in vivo*, но обеспечивающая достаточно быструю и селективную элиминацию денатурированных, мутантных или поврежденных полипептидов.

5. Субтилизиноподобные протеиназы дрожжей

Несмотря на многолетнюю историю изучения протеиназ дрожжей, свойства отдельных ферментов и их физиологическая роль в протеолитической системе клетки остаются неясными. Нами (совместно с сотрудниками ВНИИ винограда и продуктов его переработки «Магарач») были выделены протеиназы I—III винных дрожжей. Оказалось, что различные штаммы *Saccharomyces vini* на разных стадиях развития образуют различные сериновые протеиназы, которые расщепляют специфический субстрат субтилизинов Glp-Ala-Ala-Leu-pNA, но неактивны по субстратам химотрипсина Glp-Phe-pNA, трипсина Bz-Arg-pNA и тиоловых протеиназ Glp-Phe-Ala-pNA. Внутриклеточная протеиназа I проявляет максимум активности в середине экспоненциальной фазы роста дрожжей, отличается низким pH-оптимумом при гидролизе пептидных (5,0) и белковых (5,5—6,5) субстратов. Протеиназа II, появляющаяся в начале стационарной фазы, гидролизует белковые субстраты при pH 9,0 и почти неактивна по пептидным субстратам. Оба фермента ингибируются DFP и PMSF, а протеиназа II частично инактивируется HgCl_2 . Внеклеточная протеиназа III наиболее активна в начале стационарной фазы роста дрожжей. По характеру ингибирования и субстратной специфичности она может быть отнесена к сериновым субтилизиноподобным протеиназам. Фермент стабилен в диапазоне pH 2,0—6,0, что соответствует технологическим условиям брожения виноградного сусла. До последнего времени вопрос о секреции протеиназ дрожжевыми клетками являлся предметом дискуссии. В качестве наиболее яркого примера можно привести сведения об образовании внеклеточной сериновой протеиназы дрожжами *Yarovia lipolytica* [37], первичная структура которой, определенная по гену, позволяет отнести этот фермент к субтилизинам, родственным протеиназе К [38].

Наиболее известна вакуолярная протеиназа В пекарских дрожжей *Sac. cerevisiae* В [39]. По данным ингибиторного анализа и анализа первичной структуры [40], она является субтилизиноподобной тиолзависимой протеиназой. У протеиназы В, так же как у термитазы и протеиназы К, вместо Val⁶⁸ (по нумерации субтилизина BPN') имеется Cys⁶⁸, важный для активности фермента.

Необычные сериновые протеиназы дрожжей — КЕХ-1 *Kluyveromyces lactis* [41] и КЕХ-2 *Sac. cerevisiae* [42, 43]. Гены этих белков кодируют блоки порядка 814 аминокислотных остатков, причем вблизи N-конца обнаруживаются участки, в высокой степени гомологичные структуре сериновых протеиназ семейства суб-

тилизины. Известно, что КЕХ-2 может функционировать как мембраносвязанная сериновая протеиназа, осуществляющая процессинг предшественников ряда физиологически активных белков, например киллер токсина, α -фактора. При этом фермент избирательно расщепляет только связи Arg-Arg[±]Xaa, Lys-Arg[±]Xaa, что необычно для широкоспецифичных субтилизинов. По классификации [5] протеиназы КЕХ-1 и КЕХ-2 входят в подкласс I-E, образуя подсемейство субтилаз, родственных внутриклеточным субтилизиноподобным протеиназам животных, которые будут рассмотрены ниже.

6. Субтилизины растений

Зеленые растения, как известно, относятся к автотрофным организмам. Они, как правило, не используют белки непосредственно для питания, однако протеолиз у растений весьма активен при прорастании семян, формировании репродуктивных органов, увядании листьев [44]. Ранее в растениях были найдены и подробно изучены тиоловые протеиназы. В последнее десятилетие [45—47] были выделены и изучены сериновые протеиназы растений семейства молочайных и тутовых. Однако авторам не удалось получить структурные характеристики, позволяющие отнести эти ферменты к определенному семейству сериновых протеиназ. Субтилизиноподобная протеиназа кукумизин была впервые получена из сока дыни [48]. Для этого фермента была установлена последовательность аминокислот в районе активного центра -Gly-Thr-Ser-Met- [49]. Сходные ферменты были описаны и для других представителей семейства тыквенных [50, 51].

В нашей лаборатории изучены субтилизиноподобные протеиназы из увядающих листьев подсолнечника [52] и плодов *Maclura pomifera* [53]. Протеиназа из листьев подсолнечника *Helianthus annuus* L., по-видимому, близкий аналог тиолзависимых сериновых протеиназ микроорганизмов. Фермент близок по молекулярной массе к секреторным субтилизином, ингибируется не только DFP, но и соединениями ртути. Установлено, что протеиназа из листьев подсолнечника гидролизует в В-цепи инсулина 7 пептидных связей, характерных для специфичности тиолзависимых сериновых протеиназ бацилл и протеиназы К (рис. 2). По аминокислотному составу протеиназа *H. annuus* близка к известным тиолзависимым протеиназам. N-Концевая последовательность (20 остатков) фермента гомологична соответствующей последовательности термитазы (84%).

Фермент из плодов *M. pomifera* по свойствам близок к кукумизину. У протеиназ сходны величины молекулярной массы, они являются гликопротеидами. Эти протеиназы гидролизуют в В-цепи окисленного инсулина связи, образованные не только гидрофобными аминокислотами, но и окисленным цистеином и глутаминовой кислотой (рис. 2). N-Концевая последовательность протеиназы из *M. pomifera* (24 аминокислотных остатка) оказалась гомологичной соответствующей последовательности протеиназы К на 33% и грибных протеиназ I и II из *Acr. chrysogenum* на 25—30%.

Гомология протеиназ растений и протеиназ бактерий семейства субтилизинов имеет принципиально важное значение, она указывает на эволюционную связь между сериновыми протеиназами растений и прокариот.

7. Субтилизины животных

До последнего времени считалось, что сериновые протеиназы представлены у животных трипсином, химотрипсином, а также протеиназами системы гемостаза. Как отмечалось выше, в процессе работ по изучению генома дрожжей была обнаружена последовательность нуклеотидов, кодирующая протеиназу, гомологичную субтилизину бацилл. Подобным образом были найдены *fur* (ген человека, кодирующий белок фурин [54]), *pc₂* (ген инсулиномы человека — белок PC₂ [55]), *pc₃* (муриин мыши [56]), *dfur* (D-фуриин мухи дрозофилы [57]). Эти белки имеют примерно одинаковые каталитические домены, соответствующие субти-

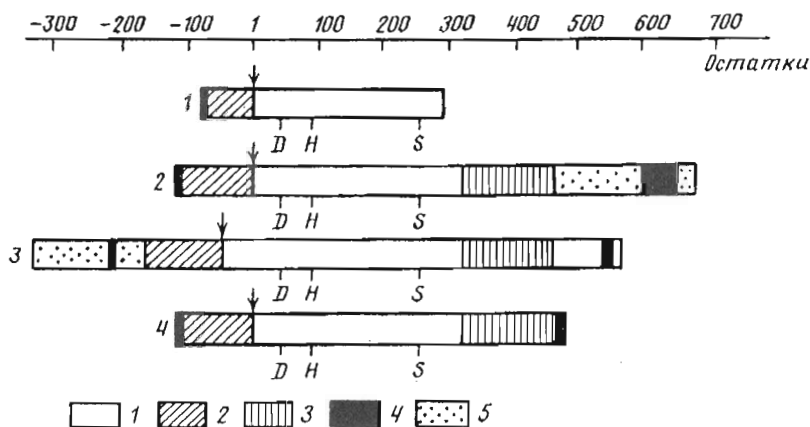


Рис. 3. Предполагаемое строение белков, соответствующих генам субтилизина BPN' (1), Fur человека (фурин) (2), D — Fur дрозофилы (D-фурин) (3), PC₃ мыши (мурин) (4). Стрелками показаны места автокаталитического расщепления -Arg-Arg[±]Хаа, Lys-Arg[±]Хаа. Обозначены домены: каталитический (1), препро (2), средний (3), некодируемый (4) и трансмембранный (5)

лизину BPN', в которых остатки Asp, His, Ser консервативны (рис. 3). Гомология аминокислотных последовательностей (в %) между белковыми доменами значительна [58]:

Белок	«Про»-домен	Каталитический домен	Средний домен
Фурин (человек)	51	69	39
D-Фурин (дрозофила)	46	62	—
PC ₂ (человек)	33	51	37
PC ₃ (мышь)	42	59	34

Фурин имеет район, богатый цистеином, функция которого неясна, а D-фурин обладает гидрофобным участком в N-концевой части молекулы, который может служить потенциальным трансмембранным якорем. Таким образом, каталитическая часть молекулы у ферментов животных окружена доменами, необходимыми для закрепления ее в определенном компартменте клетки. Функция таких субтилизиноподобных протеиназ — активация белков-предшественников путем расщепления связи после пары основных аминокислот -Arg-Arg- или -Lys-Arg-Хаа-, что сравнимо с субстратной специфичностью субтилизиноподобной протеиназы дрожжей KEX-2.

Выделены и охарактеризованы также трипептидилпептидазы II из печени крысы [57] и эритроцитов человека [60]. Они отличаются необычно высокой молекулярной массой (более 10⁶) и состоят из субъединиц с молекулярной массой 135 000. Гомология N-концевой части молекулы трипептидилпептидазы II из печени крысы составляет 56% с субтилизином BPN'. Протеиназа ингибируется DFP и PMSF, а также реагентами на SH-группу, что указывает на наличие цистеина, важного для активности фермента.

Приведенные примеры не согласуются с традиционными представлениями о типичных субтилизинах. В связи с этим интересно сопоставить наиболее консервативные участки последовательностей, включающих в себя остатки активного центра субтилизиноподобных протеиназ (рис. 4). Все субтилизины с необычной субстратной специфичностью имеют замены в консервативных последовательностях. Теоретически можно представить, что замена Thr³³ → Asp³³ (приводящая к образованию последовательности Asp³²-Asp³³) и замена остатка His⁶⁷

	32	64	221
Субтилизин BPN'	...DTG... [*] HGTHVAGT... [*] GTSM... [*]		
Субтилизин Карлсберг	...DSG...HGTHVAGT...GTSM...		
Термитаза	...DTG...HGTHCAGT...GTSM...		
Протеиназа К	...DTG...HGTHCAGT...GTSM...		
Галолизин	...DQG...HGTHVGGI...GTSM...		
Протеиназа В дрожжей	...DTG...HGTHVSGT...GTSM...		
KEX-2	...DDG...HGTRCAGE...GTSAA...		
Трипептидилпептидаза II	...DSN...HGTHVASI...GTSMS...		
Фурин	...DDG...HGTRCAGE...GTSAS...		

Рис. 4. Сравнение консервативных участков — последовательностей, включающих в себя остатки активного центра субтилизиноподобных протеиназ. Подчеркнуты аминокислотные замены, звездочкой отмечены аминокислоты активного центра

на Arg (в непосредственной близости от Cys⁶⁸, важного для активности тиолзависимых сериновых протеиназ) могут заметно изменить функциональные свойства активного центра. Как показано в работе [54], у фурина отмечается увеличение отрицательно заряженных боковых цепей субстратсвязывающей поверхности по сравнению с субтилизинами бацилл. Это может способствовать селективному связыванию положительно заряженных остатков субстрата. Однако для строгого доказательства высказанных предположений потребуются специальные исследования.

Как видно из вышеизложенного, субтилизины представляют собой семейство сериновых протеиназ, объединяющее ферменты с весьма различными свойствами; они гораздо шире распространены в природе, чем предполагалось ранее. Эти ферменты обнаружены в архебактериях, бактериях, стрептомицетах, грибах, дрожжах, растениях, у насекомых и млекопитающих. Вероятно, субтилизины присутствовали еще у протобионтов — общих предшественников архебактерий, эубактерий и эукариот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marcland F. S., Smith E. L. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 5198.
2. Hirono S., Akagawa H., Iitaka Y. // J. Mol. Biol. 1984. V. 178. P. 389—413.
3. McPhalen C. A., James M. N. C. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 6582—6598.
4. Bode W., Papatokos E., Musil D. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 155. P. 673—693.
5. Siezen R. J., de Vos W. M., Leunissen J. A. M., Dijkstra B. W. // Prot. Eng. 1991. V. 4. P. 719—737.
6. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова Н. Г., Куприянова Т. И., Хохлова Ю. М., Усайте И. А., Логинова Л. Г., Тимохина Е. А. // Биохимия. 1980. Т. 45. № 10. С. 1871—1880.
7. Behnke U., Schättnatus E., Ruttloff H., Hohne W. E., Frommel C. // Acta biol. et med. germ. 1978. V. 37. № 8. S. 1185—1192.
8. Остерман А. Л. Химическое исследование внеклеточной сериновой тиолзависимой протеиназы и карбоксипептидазы Т термоактиномицетов: Автореф. канд. дис. М.: МГУ, 1983.
9. Hansen G., Frommel C., Hausdorf G., Bauer S. // Acta biol. et med. germ. 1978. V. 41. № 2/3. S. 137—144.
10. Честухина Г. Г., Епремян А. С., Гайда А. В., Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1649—1658.
11. Честухина Г. Г., Загнитко О. П., Ревина Л. П., Клепикова Ф. С., Степанов В. М. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 10. С. 1724—1730.

12. Mizusawa K., Yoshida E.//J. Biol. Chem. 1973. V. 248. P. 4417—4423.
13. Хайдарова Н. В., Руденская Г. Н., Ревина Л. П., Степанов В. М., Егоров Н. С.//Биохимия. 1990. Т. 55. № 6. С. 1110—1119.
14. Тепляков А. В., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Фроммель К., Хене В. Е.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 437—447.
15. Meloin B., Baudys M., Kostka V., Hausdorf G., Frommel C., Hohne W. E.//FEBS Lett. 1985. V. 183. P. 195—200.
16. Jacobs M., Eliasson M., Uhlen M., Flock G. I.//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. P. 8913—8926.
17. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. P.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 100. № 4. P. 1680—1687.
18. Isotova L. S., Strongin A. Ya., Chekulaeva L. N., Sterkin V. T., Ostoslavskaya V. I., Lublinskaya L. A., Timokhina E. S., Stepanov V. M.//J. Bacteriol. 1983. V. 155. P. 826—830.
19. Matsuzawa H., Tokugawa K., Hamaoki M., Mizoguchi M., Taguchi H., Terada I., Kwon S.-T., Ohta T.//Eur. J. Biochem. 1988. V. 7. P. 441—447.
20. Kamekura M., Seno Y.//Biochem. Cell. Biol. 1990. V. 68. P. 352—359.
21. Kamekura M., Seno Y., Holmes M. L., Diall-Smith M. L.//J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 3. P. 736—742.
22. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Revina L. P., Gryaznova Yu. B., Lysogorskaya E. N., Filippova I. Yu., Ivanova I. I.//Biochem. J. 1992. V. 285. P. 281—286.
23. Руденская Г. Н., Ревина Л. П., Грязнова Ю. Б., Лысогогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Филиппова И. Ю., Степанов В. М., Иванова И. И.//Биохимия. 1992. Т. 57. № 8. С. 1230—1241.
24. Gunkel F. A., Gassen H. G.//Eur. J. Biochem. 1989. V. 179. P. 185—194.
25. Гайда А. В., Остерман А. Л., Руденская Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1981. Т. 46. С. 181—189.
26. Васильева Л. И., Руденская Г. Н., Крестьянова И. Н., Ходова О. М., Бартошевич Ю. Э., Степанов В. М.//Биохимия. 1985. Т. 50. № 3. С. 355—362.
27. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Vasilyeva L. I., Krestyanova I. N., Khodova O. M., Bartoshevich Yu. E.//Int. J. Biochem. 1986. V. 18. P. 369—375.
28. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Васильева Л. И., Крестьянова И. Н., Ходова О. М., Бартошевич Ю. Э.//Биохимия. 1986. Т. 51. № 9. С. 1476—1483.
29. Janu K. D., Mayer B.//Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1985. B. 366. S. 485—492.
30. Tatsumi A., Ogana Y., Murakami S., Oshida Y., Murakami K., Masaki A., Kawabe H., Arimura H., Nakano E., Notai H.//Mol. Gen. Genet. 1989. V. 219. № 1/2. P. 33—38.
31. Лавренова Г. И., Гульник С. В., Калугер С. В., Боровикова В. П., Ревина Л. П., Степанов В. М.//Биохимия. 1984. Т. 49. № 4. С. 531—539.
32. Betzel Ch., Teplyakov A. V., Harutyunyan E. N., Saenger W., Wilson K. S.//Prot. Engineering. 1990. V. 3. № 3. P. 161—172.
33. Strongin A. Ya., Gorodetsky D. I., Kuznetsova I. A., Yanonis V. V., Abramov Z. T., Belyanova L. P., Baratova L. A., Stepanov V. M.//Biochem. J. 1979. V. 179. P. 333—339.
34. Ревина Л. П., Сурова И. А., Янонис В. В., Остославская В. И., Тимохина Е. А., Левин Е. Д., Степанов В. М.//Всес. симп. «Химия белков»: Тез. докл. Тбилиси, 1990. С. 110.
35. Koide Y., Nakamura A., Uozumi T., Verru T.//J. Bacteriol. 1986. V. 167. P. 110—116.
36. Маркарян А. Н., Остославская В. И., Швядас В. К., Якушева Л. Д., Люблинская Л. А., Стронгин А. Я., Степанов В. М.//Биохимия. 1980. Т. 45. № 7. С. 1319—1327.
37. Ogrzyziak D. M., Scharf S. G.//J. Gen. Microbiol. 1982. V. 128. № 6. P. 1225—1234.
38. Matoba S., Fukayama J., Wing R. A., Ogrzyziak D. M.//Mol. Cell. Biol. 1988. V. 8. P. 4904—4916.
39. Kominami E., Hofschulte H., Leusckel L., Maier K., Holzer H.//Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 661. P. 135—141.
40. Mochle C. M., Tizard R., Lemmon S. K., Smart J., Jones E. W.//Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. P. 4390—4399.
41. Tanguy-Rougeau C., Wesolowski-Louvel M., Fukuhara H.//FEBS Lett. 1988. V. 234. P. 464—470.
42. Mizuno K., Nakamura T., Oshima T., Tanaka S., Matsuo H.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. V. 156. № 2. P. 246—254.
43. Fuller R. S., Sterne R. E., Thorner J.//Ann. Rev. Physiol. 1988. V. 50. P. 345—362.
44. Кондратьева М. Н., Камалова Т. Г.//Физиология и биохимия культ. растений. 1983. Т. 15. № 2. С. 107—115.

45. Lynn K. R., Clevette-Radford N. A.//Phytochemistry. 1986. V. 25. № 7. P. 1559—1561.
46. Lynn K. R., Clevette-Radford N. A.//Phytochemistry. 1988. V. 27. № 1. P. 45—50.
47. Lynn K. R.//Phytochemistry. 1988. V. 27. № 7. P. 1987—1991.
48. Kaneda M., Tominaga N.//Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. № 2. P. 498—492.
49. Kaneda M., Ohmine H., Yonezawa H., Tominaga N.//J. Biochem. 1984. V. 95. P. 815—829.
50. Kaneda M., Sobue A., Eida S., Tominaga N.//J. Biochem. 1986. V. 99. P. 569—577.
51. Uchikoba T., Horita H., Kaneda M.//Phytochemistry. 1990. V. 29. № 6. P. 1979—1981.
52. Руденская Г. Н., Степанов В. М., Захарова Ю. А., Ревина Л. П., Ходова О. М.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 10. С. 1753—1755.
53. Руденская Г. Н., Степанов В. М., Богданова Е. А., Ревина Л. П., Головкин Б. Н.//III симп. «Химия протеролитических ферментов»: Тез. докл. Москва, 1993. С. 54.
54. Ven W. J. M. van de, Voorberg J., Fontijn R., Pannekoek H., Ouweland A. M. W. van den, Duijnhoven H. L. P. van, Roebroek A. J. M., Siezen R. J.//Mol. Biol. Repts. 1990. V. 14. P. 265—275.
55. Smeekens S. P., Steiner D. F.//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 2997—3000.
56. Smeekens S. P., Avruch A. S., La Mendola J., Chan S. J., Steiner D. F.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 340—344.
57. Roebroek A. J. M., Pauli I. G. L., Zhang Y., Ven W. J. M. van de//FEBS Lett. 1991. V. 289. № 2. P. 133—137.
58. Barr Ph. J.//Cell. 1991. V. 66. P. 1—3.
59. Tomkinson B., Wernstedt Ch., Hellman U., Zetterqvist O.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7508—7512.
60. Tomkinson B., Jonsson A.-K.//Biochemistry. 1991. V. 30. № 1. P. 168—174.

Поступила в редакцию
8.VII.1993

G. N. Rudenskaya

NEW SUBFAMILIES OF SUBTILISINS

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Recent data on serine proteinases belonging to the subtilisin family are reviewed. The following subtilisin subfamilies are discussed: thiol-dependent serine proteinases, intracellular serine proteinases of bacilli, subtilisin-like proteinases from various taxons (archaeobacteria, fungi, yeasts, plants, animals).