



УДК 577.152.34'14

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ КАМЧАТСКОГО КРАБА *Paralithodes camtschatica*

© 1995 г. Г. Н. Руденская, О. Г. Купенко, В. А. Исаев,
В. М. Степанов, Я. Е. Дунаевский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, ГСП-3, В-234, Воробьевы горы, кафедра химии природных соединений

Поступила в редакцию 17.03.94 г. После доработки 16.05.94 г.

Гомогенная карбоксипептидаза PC из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* была получена с помощью биоспецифической хроматографии на сорбентах, содержащих аргинин, гидролизат протамина и фенилаланин в качестве лигандов, с выходом 23% и степенью очистки 37.4. Фермент имеет молекулярную массу 34 кДа по данным электрофореза с SDS, рI 3.1. Оптимум pH, определенный по гидролизу Dnp-Ala-Ala-Arg, – 6.5; диапазон стабильности pH 5 - 8 в присутствии Ca²⁺, температурный оптимум 55°C, K_m 0.4 мМ. Карбоксипептидаза активируется ионами Co²⁺, Ca²⁺, ингибируется EDTA и *o*-фенантролином, что свидетельствует о принадлежности ее к металлокарбоксипептидазам. Фермент эффективно отщепляет C-концевые аминокислоты Arg и Lys, а также Phe и Tyr. Остатки Pro, Glu, Asp не отщепляются и препятствуют разрыву предшествующей связи. Таким образом, карбоксипептидаза PC камчатского краба обладает смешанной субстратной специфичностью, характерной для карбоксипептидаз речного рака и микробных карбоксипептидаз T и SG. Аминокислотный состав: Asp₄₁Thr₂₄Ser₂₂Glu₃₂Pro₁₅Gly₃₂Ala₂₉1/2Cys₅Val₁₉Met₈Ile₁₄Leu₂₀Tyr₁₈Phe₈Lys₇His₄Arg₈Trp₄. N-Концевая последовательность фермента имеет 40%-ную степень гомологии с N-концевой последовательностью карбоксипептидазы речного рака.

Ключевые слова: карбоксипептидаза PC, металлокарбоксипептидаза, смешанная субстратная специфичность, выделение.

Протеолитические ферменты членистоногих постоянно привлекают внимание исследователей. Хорошо изучены эндопептидазы различных видов крабов, речного рака, креветки. Однако сведения об экзопептидазах животных этого семейства весьма ограничены. Наиболее известна карбоксипептидаза речного рака [1], для которой установлена полная последовательность аминокислот [2]. В литературе описаны некоторые свойства карбоксипептидазы лангуста [3], креветки [4], которые, как и карбоксипептидазы млекопитающих, являются металлоферментами, содержащими цинк в активном центре. К этой же группе карбоксипептидаз относятся ферменты из термоактиномицетов и стрептомицетов.

Гепатопанкреас камчатского краба *Paralithodes camtschatica* богат протеолитическими ферментами. Известны трипсин [5], эластаза [6] и хи-

мотрипсиноподобные ферменты [7] из этого источника. Настоящее исследование посвящено выделению и изучению свойств карбоксипептидазы из гепатопанкреаса камчатского краба (далее – карбоксипептидаза PC).

Задача настоящей работы сводилась к разделению протеиназ с различной субстратной специфичностью (табл. 1), содержащихся в препарате Морикразы, полученном нами ранее [8] из гепатопанкреаса камчатского краба. Выделение и очистку карбоксипептидазы PC проводили хроматографией на аффинных сорбентах с лигандами, отвечающими специфичности карбоксипептидаз В и А: на Arg-агарозе, ПТГ-сефарозе и Phe-агарозе (табл. 2).

Применение градиентной элюции при хроматографии Морикразы на Arg-агарозе (рис. 1а) позволило в значительной мере отделить карбоксипептидазу PC (пик IV) от других белков (пики I - III) и особенно от трипсина (пик V), который также имеет сродство к Arg-агарозе, но более прочно удерживается сорбентом и элюируется только при добавлении 25% изопропанола в 1 М NaCl. Фракцию IV хроматографировали на ПТГ-сефарозе

Сокращения: ПТГ-сефароза – аффинный сорбент, содержащий трипсиновый гидролизат протамина в качестве лиганда, АН-сефароза – аминогексилсефароза, Dnp – динитрофенил, BSA – бычий сывороточный альбумин, рNA – *n*-нитроанилид; все аминокислоты, кроме особо указанных, L-ряда.

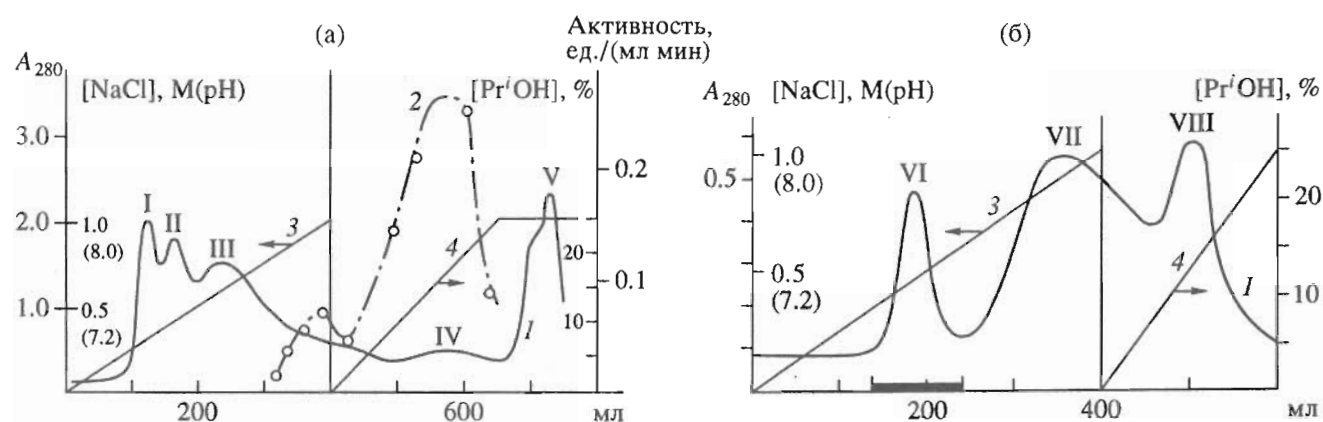


Рис. 1. Разделение ферментов Морикразы на Arg-агарозе (а) и пика IV (рис. а) на ПТГ-сефарозе (б): 1 – A_{280} , 2 – активность карбоксипептидазы, 3 – градиент концентрации NaCl (0 - 1 М) и pH (6.4 - 8.0), 4 – градиент концентрации изопропанола (0 - 25%) в 1 М NaCl (pH 8.0). Отмечена фракция (пик VI), проявляющая карбоксипептидазную активность.

(рис. 16). После этой стадии очистки карбоксипептидаза PC (пик VI) содержит примесь хомотрипсиноподобной протеиназы, которая, как следует из работы [7], имеет сродство к сорбентам с

Таблица 1. Активность Морикразы при гидролизе специфических субстратов протеиназ разных классов

Субстрат	Удельная активность, ед. акт./мг
Bz-Arg-pNA	0.27
Z-D-Ala-Arg-pNA	6.73
Woc-Arg-pNA	0.11
Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA	4.02
Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA	4.26
Glp-Phe-pNA	0.04
Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	0.34
Woc-Ala-Ala-Ala-pNA	0.025
Dnp-Gly-Gly-Arg	0.057
Dnp-Gly-Gly-Val-Arg	0.10
Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg	0.23
Glp-Phe-Ala-pNA	0.27
Glp-Phe-Leu-pNA	0.11

Таблица 2. Выделение и очистка карбоксипептидазы из Морикразы

Стадия очистки	Суммарный белок, ОЕ ₂₈₀	Активность		Выход, %	Степень очистки
		общая, ед. акт.	удельная, ед. акт./ОЕ ₂₈₀		
Исходный раствор Морикразы	497	92.7	0.19	100	1
Хроматография на:					
Arg-агарозе	96	51.6	0.54	55.7	2.8
ПТГ-сефарозе	10.8	45.1	4.2	48.7	22.1
Phe-агарозе	3.0	21.3	7.1	23.0	37.4

фенилаланином в качестве лиганда. При последующей хроматографии на Phe-агарозе карбоксипептидаза PC также прочно сорбировалась на носителе, что свидетельствует о заметном сродстве карбоксипептидазы к фенилаланину. Ферменты разделяли элюцией в градиенте концентрации изопропанола (0 - 25%) в 1 М NaCl. В результате с выходом 23% была получена карбоксипептидаза PC, гомогенная по данным хроматофокусирования (рис. 2).

Выделенная карбоксипептидаза PC при N-концевом анализе давала одну N-концевую последовательность аминокислот, что свидетельствует о ее индивидуальности (рис. 3).

В табл. 3 представлены сравнительные характеристики полученного фермента и некоторых других металлокарбоксипептидаз животного и микробного происхождения. Молекулярная масса фермента, определенная электрофорезом в присутствии SDS, равна 34000, как и у карбоксипептидаз из других источников. pH-Оптимум активности, так же как у фермента речного рака, лежит при pH 6.5, в то время как у других карбоксипептидаз он наблюдается при более высоких значениях pH. pH-Оптимум стабильности карбоксипептидазы PC также несколько сдвинут в кислую область, температурный оптимум активности выражен достаточно четко и имеет более узкие границы, чем у термостабильных ферментов микроорганизмов *Thermoactinomyces vulgaris* [9], *Streptomyces griseus* [10], *Streptomyces spheroides* [11]. Гидролиз Dnp-Ala-Ala-Arg карбоксипептидазой PC характеризуется следующими параметрами: K_m 0.4 мМ, k_{cat} 95 с⁻¹.

Карбоксипептидаза краба частично инактивируется при обессоливании, что характерно для металлокарбоксипептидаз. Добавление 1 мМ Ca²⁺ в буферные системы значительно повышает устойчивость фермента к изменениям температуры и pH.

Ионы Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} в концентрации 0.5 мМ уже через 1 ч ингибируют фермент на 50%. Ионы Hg^{2+} вызывают уменьшение активности только через сутки. Co^{2+} и особенно Ca^{2+} активируют карбоксипептидазу. Полное ингибирование фермента наблюдалось под действием 1 мМ EDTA за 24 ч, остаточная активность после действия *o*-фенантролина за то же время составила 5.6%. Медленная реакция с ингибиторами отмечается и для карбоксипептидазы лангуста, у которой остаточная активность (4%) сохранялась даже через 72 ч инкубирования в 0.1 М EDTA [3].

Таким образом, характер ингибирования подтверждает принадлежность карбоксипептидазы краба к металлокарбоксипептидазам.

Наибольший интерес вызывает субстратная специфичность фермента. Как известно, некоторые беспозвоночные животные (лангуст, креветка) имеют карбоксипептидазы А и В [3, 4], в то время как у речного рака обнаружена карбоксипептидаза со смешанной субстратной специфичностью [1], объединяющей черты, присущие панкреатическим карбоксипептидазам А и В млекопитающих. Это явление характерно и для карбоксипептидаз Т и SG микроорганизмов [9 - 11].

Субстратную специфичность карбоксипептидазы камчатского краба исследовали с помощью пептидов различной длины и состава (табл. 4). Оказалось, что карбоксипептидаза PC с наибольшей скоростью отщепляет С-концевой аргинин в трипептидах (соединения 19, 21) и немного медленнее лизин (20, 22). Со сравнимой скоростью идет отщепление фенилаланина, аланина, тирозина. Значительно медленнее гидролизуются С-концевой триптофан (16). Связи, образованные глицином и пролином, не гидролизуются вовсе.

Незащищенные дипептиды Val-Val и Gly-Gly за 40 мин в приведенных условиях практически не расщепляются. Трипептиды и тетрапептиды гидролизуются быстрее, чем дипептиды, при этом результат гидролиза зависит от природы аминокислоты в положении P_1 и P_1' . Так, при сравнении N-динитрофенилтетрапептидов с С-концевым аргинином (24 - 27) видно, что скорость отщепления аргинина снижается почти на порядок для

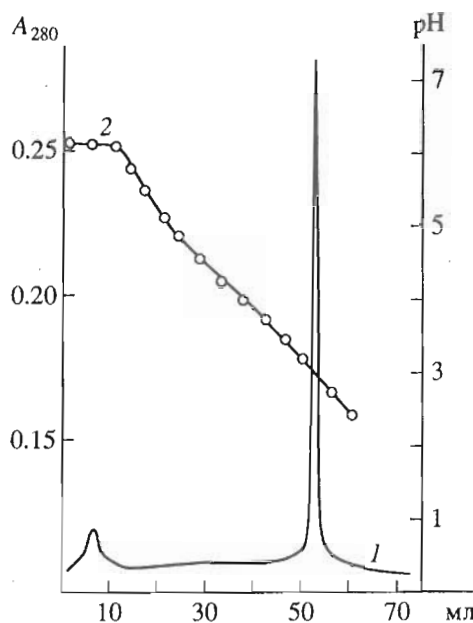


Рис. 2. Хроматофокусирование карбоксипептидазы: 1 - A_{280} , 2 - pH.

следующего ряда аминокислот в положении P_1 : Val > Ile > Leu > Phe. Сопоставление результатов деградации пептидов, содержащих триптофан (29 - 31), показало, что гидролиз связей, образованных этой аминокислотой, очень затруднен. Замедляют или полностью останавливают реакцию гидролиза дикарбоновые аминокислоты (17, 32, 33) и пролин (12, 34, 35), а также D-аминокислоты (18).

Чтобы моделировать совместное действие эндопротеиназы и карбоксипептидазы PC *in vivo*, мы гидролизовали бычий сывороточный альбумин сначала трипсином краба (рис. 1, пик V), а затем карбоксипептидазой PC по 24 ч и сопоставили полученный результат с аминокислотным анализом 48-часового гидролизата BSA (табл. 5). Как видно из приведенных данных, наивысшая степень ферментативного отщепления была достигнута для аргинина и лизина, затем идут фенилаланин и тирозин, немного хуже (50 - 30%) освобождаются лейцин и изолейцин. Отщепляется

Таблица 3. Некоторые свойства карбоксипептидаз из различных источников

Характеристика фермента	Камчатский краб	Лангуст [3]	Речной рак [2]	Креветка [4]	Бык [13]	<i>Th. vulgaris</i> [9]	<i>Str. sphe-roides</i> [11]
pH-оптимум активности	6.5	-	6.5	6.5 - 8	8.0	7 - 8	7.6
pH-оптимум стабильности	5 - 8	-	-	6	-	-	6 - 8
T-оптимум	50 - 60	-	-	-	-	до 70	50
pI	3.1	-	4.0	3.5	6.0	5.3	4.7
Молек. масса, Да	34000	34000	33900	34000	35700	38000	34000

около 25% валина, серина, треонина, аланина, гистидина, крайне невелико отщепление дикарбоновых аминокислот и глицина, пролина не обнаружено вовсе. Трудно судить об отщеплении триптофана ввиду его незначительного содержания в белке, в гидролизате обнаружен цистин.

Полученные данные хорошо согласуются с результатами, приведенными в табл. 4. Можно сделать вывод, что в условиях комбинированного расщепления белка эндо- и экзопептидазой карбоксипептидаза РС проявляет специфичность как типа А, так и типа В. Кроме карбоксипептидазы речного рака другим близким к карбоксипептидазе краба ферментом в этом отношении является карбоксипептидаза Т из *Th. vulgaris*. По данным рентгеноструктурного анализа [12], последний

Таблица 4. Субстратная специфичность карбоксипептидазы краба (в скобках приведена удельная активность в нмоль/мин ОЕ₂₈₀)

Номер	Пептид	Номер	Пептид
1	Val-Val (0)	13	Z-Val-Ala(0.7)-Phe (60.5)
2	Gly-Gly (2)	14	Z-Ala-Ala(40.8)-Phe (40.8)
3	Z-Ala-Ala (0.6)	15	Z-Ala-Ala(49.6)-Tyr (64.7)
4	Z-Glu-Phe (11)	16	Z-Ala-Ala(9.5)-Trp (9.6)
5	Z-Glu-Tyr (60.5)	17	Z-Ala-Gln-Gly (0)
6	Z-Gly-Leu (48)	18	Вос-Тыр-D-Ala-Phe (0)
7	Z-Ala-Gln (72)	19	Dnp-Gly-Gly-Arg (166.8)
8	Вос-Phe-Met (27.6)	20	Dnp-Gly-Gly-Lys (88.3)
9	Вос-Тыр-Ala (19.2)	21	Dnp-Ala-Ala-Arg (104.6)
10	Вос-Ile-Phe (2)	22	Dnp-Ala-Ala-Lys (85.0)
11	Вос-Asn-Phe (55)		
12	Вос-Phe-Pro (0)		
Номер	Пептид		
23	Dnp-Gly-Gly-Val(2.8)-Lys (62.1)		
24	Dnp-Gly-Gly-Val(6.2)-Arg (255.0)		
25	Dnp-Gly-Gly-Ile(10.5)-Arg (114.5)		
26	Dnp-Gly-Gly-Leu(28.8)-Arg (49.0)		
27	Dnp-Gly-Gly-Phe(3.4)-Arg (16.7)		
28	Met-Arg(66.4)-Phe(66.4)-Ala (76.0)		
29	Leu-Trp(16.6)-Met(199)-Arg (324)		
30	Leu-Trp(16.6)-Met(94.0)-Arg(98.6)-Phe (103.8)		
31	Leu-Trp(21.5)-Met(103)-Arg(103)-Phe(103)-Ala(103)		
32	Arg-Lys-Asp-Val-Tyr (40)		
33	Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe (0)		
34	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (154)		
35	Тыр-D-Met-Gly-Phe-Pro		

фермент имеет сходную с карбоксипептидазой А быка третичную структуру. Это обстоятельство, а также наличие смешанного типа субстратной специфичности карбоксипептидазы Т подтверждают предположение о существовании общего предшественника и дивергентной эволюции ферментов с образованием двух подсемейств с различной субстратной специфичностью.

По аминокислотному составу исследуемая карбоксипептидаза наиболее близка к металлокарбоксипептидазам речного рака и langуста (табл. 6), однако сумма кислых аминокислот в ее составе заметно выше, что при уменьшенном содержании лизина и аргинина характеризует фермент как кислый белок.

Наиболее существенные свидетельства родства исследуемого фермента с известными карбоксипептидазами животных дает сравнение N-концевых аминокислотных последовательностей (рис. 3). На исследованном участке наблюдается 40% совпадений аминокислотных остатков карбоксипептидазы краба и речного рака. Степень совпадений с карбоксипептидазой langуста и карбоксипептидазой *Str. griseus* вдвое ниже, а с карбоксипептидазой из поджелудочной железы крысы составляет всего 14%. Таким образом, карбоксипептидаза РС камчатского краба по многим свойствам близка к карбоксипептидазам беспозвоночных животных и особенно к карбоксипептидазе речного рака.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходного препарата использовали протеолитический комплекс Морикразы, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба фирмой "Тринита".

Для аффинной хроматографии синтезировали аргинин-агарозу присоединением аргинина к АН-агарозе ("Кемотех", Эстония) с помощью *l*-бензохинона [17]. Phe-агарозу синтезировали тем же способом. ПТТ-сефарозу получали присоединением к АН-сефарозе (Pharmacia, Швеция) с помощью *l*-бензохинона пептидов трипсинового гидролизата сальмина - протамина молот осетровых рыб.

Буферные растворы: 0.1 М ацетат аммония (рН 6.4) с 1 мМ Ca(CH₃COO)₂ (А), 0.05 М трис-НСl (рН 8) с 1 М NaCl (Б).

Выделение карбоксипептидазы РС. Раствор Морикразы в буфере А наносили на колонку (3 × 10 см) с Arg-агарозой, уравновешенной тем же буфером. После промывки проводили градиентную элюцию: буфер А - буфер Б по 200 мл, затем 0 → 25% изопропанол в буфере Б (200 мл) и 25% изопропанол в буфере Б (100 мл). Фракцию, содержащую карбоксипептидазу, обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным

Камчатский краб	A F D X T Q Y X T F E E K N S K L D G -
Речной рак [2]	M D W T S Y N D Y D E I N A W L D S -
Лангуст [3]	Y S E K Y N T W D E I A A W T X Q -
Крыса [16]	A S G H S Y T K Y N K W E T I E A W Q Q V -
<i>Str. griseus</i> [15]	D F P P A D S R Y N N Y A E M N A A T D A -

Рис. 3. N-Концевые последовательности карбоксипептидазы камчатского краба и карбоксипептидаз из других источников. Подчеркнуты совпадающие аминокислоты.

буфером А, и наносили на колонку (2.5 × 15 см) с ПТГ-сефарозой, уравновешенной тем же буфером. Элюцию с ПТГ-сефарозы проводили в тех же условиях, как и с Arg-агарозы. Фракцию, содержащую карбоксипептидазу, после обессоливания на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным буфером А, наносили на колонку (1.2 × 6 см) с Rhe-агарозой, промывали буферами А и Б, затем элюировали в градиенте концентрации изопропанола (0 → 25%) в буфере Б. Фракцию, содержащую активный фермент, обессоливали на сефадексе G-25 и лиофильно высушивали.

Активность карбоксипептидазы определяли по скорости гидролиза Dnp-Ala-Ala-Arg ("Диа-М", Россия) по модифицированной методике [9]. Использовали раствор субстрата в буфере А с концентрацией 0.2 мг/мл. За единицу активности принимали активность фермента, гидролизующего 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Субстратную специфичность карбоксипептидазы изучали по скорости гидролиза хромогенных пептидных субстратов [9] и по количеству свободных аминокислот после ферментативного гидролиза пептидов известного строения в 0.05 М триэтиламинобикарбонатном буфере, рН 6.4, в молярном отношении фермент-субстрат 1 : 100 (определение проводили на аминокислотном анализаторе Hitachi-835, Япония). Для определения субстратной специфичности карбоксипептидазы (табл. 4) использовали пептиды производства Serva (Германия) и "Диа-М" (Россия).

Для исследования зависимости активности фермента от концентрации субстрата применяли растворы Dnp-Ala-Ala-Arg в буфере А с концентрациями 0.15 - 0.5 мг/мл и раствор карбоксипептидазы (0.25 мг/мл) в том же буфере.

Зависимость активности карбоксипептидазы от рН определяли по расщеплению Dnp-Ala-Ala-Lys в интервале рН 5.75 - 6.90 (ацетатный буфер, 1 мМ Са(ОАс)₂).

Зависимость стабильности карбоксипептидазы от рН определяли по расщеплению Dnp-Gly-Gly-Val-Arg в интервале рН 5.0 - 8.75 (0.1 М трис-Н₃РO₄-буфер, 1 мМ Са(ОАс)₂). К 0.9 мл буфера добавляли 100 мкл раствора фермента (30 мг/мл) в 0.025 М ацетате аммония и измеряли активность

сразу же после добавления фермента, затем через 4 ч, 1 и 3 сут хранения при комнатной температуре.

Зависимость активности карбоксипептидазы от температуры определяли по расщеплению субстрата Dnp-Gly-Gly-Met-Arg в буфере А. Раствор субстрата инкубировали 2 мин при 21.2, 37, 44.6, 48, 51.8 и 61.6°C, после чего добавляли аликвоту раствора фермента (1.3 мг/мл) в том же буфере.

Влияние ионов металлов и ингибиторов на активность карбоксипептидазы. К 500 мкл раствора фермента (0.125 мг/мл) в 0.025 М ацетате аммония

Таблица 5. Аминокислотный состав кислотного гидролизата BSA (А) и ферментативного гидролизата, полученного последовательным действием на BSA трипсина краба (пик V, рис. 1) и карбоксипептидазы PC (Б)*

Аминокислоты в гидролизатах	Количество аминокислоты, нмоль		(А/Б) × 100, %
	А	Б	
Asp	9.8	0.3	3
Thr	6.1	1.25	20.5
Ser	4.2	0.95**	22.6**
Glu	16.9	1.3	8.0
Pro	5.4	0	0
Gly	2.9	0.25	8.6
Ala	8.5	2.1	24.7
Val	6.7	1.7	26.1
1/2 Cys	2.9	0.8	27.6
Met	1.0	0.07	3.7
Ile	2.2	0.7	31.1
Leu	12.3	6.1	49.6
Tyr	3.5	2.1	60.0
Phe	5.1	3.3	64.7
Lys	11.3	9.1	81.0
His	3.1	0.8	24.2
Arg	4.5	4.1	91.1

* А - гидролиз 5.7 М НСl, 48 ч; Б - гидролиз каждым ферментом по 24 ч.

** Сумма отщепленных остатков серина, аспарагина и глутамина.

Таблица 6. Аминокислотный состав карбоксипептидаз из различных источников

Аминокислота	Камчатский краб	Лангуст [3]	Речной рак [2]	Креветка [4]	Акула [14]	Бык [13]	<i>Th. vulgaris</i> [9]
Asx	41	33	43	45	31	28	45
Thr	24	24	24	22	25	27	26
Ser	22	32	22	23	25	27	29
Glx	32	21	23	23	20	25	30
Pro	15	13	13	14	14	12	16
Gly	32	22	25	26	20	22	28
Ala	29	27	23	22	24	22	20
1/2 Cys	5	8	2	4	7	7	4 - 5
Val	19	13	19	17	17	14	18
Met	8	4	5	5	8	6	8
Ile	14	15	17	15	20	16	14
Leu	20	19	20	21	17	21	16
Tyr	18	22	20	20	20	22	29
Phe	8	12	11	11	9	12	12
His	4	4	5	6	4	7	7
Lys	7	15	11	11	15	17	15
Arg	8	13	10	9	14	13	13
Trp	4	8	10	7	10	8	5
Сумма	306	305	303	302	299	306	335 - 336

добавляли по 10 мкл 0.025 М растворов солей тяжелых металлов: CuSO_4 , $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, $\text{Cd}(\text{OAc})_2$, $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, CoCl_2 , NiCl_2 , SnCl_2 , FeSO_4 (конечная концентрация ионов металлов 0.5 мМ). В растворе AgNO_3 конечная концентрация ионов Ag^+ была в 3 раза ниже. Растворы инкубировали 1 ч при 37°C, после чего измеряли активность фермента по гидролизу Dnp-Ala-Ala-Lys. Ингибирование *o*-фенантролином (Serva, Германия), EDTA (Reanal, Венгрия) проводили при молярном соотношении фермент-ингибитор 1 : 200. Инкубацию осуществляли в 0.05 М трис-HCl-буфере (pH 8.5) от 0.5 до 24 ч при 20°C; концентрации ингибиторов составляли 2 мМ.

Изоэлектрическую точку карбоксипептидазы определяли методом хроматофокусирования. На колонку (0.8 × 10 см) с РВЕ-94 (Pharmacia, Швеция) наносили 3 мг белка. Градиент pH (6.15 - 2.7) был получен из 25 мМ гистидина, pH 6.15 (стартовый буфер), и градиентного полибуфера РВ-96, доведенного до pH 2.7.

Молекулярную массу денатурированной 80% фенолом карбоксипептидазы определяли электрофоретически в 12.5% ПААГ с SDS. В качестве стандартов использовали BSA (67000), овальбумин (43000), карбоангидразу (30000), соевый ингибитор трипсина (20100), α -лактальбумин (14400).

Для определения аминокислотного состава фермент гидролизovali 5.7 н. HCl при 105°C в вакуумированных ампулах в течение 48 ч и анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi-835. Метионинсульфон и цистеиновую кислоту определяли после окисления надмуравьиной кислотой, а триптофан – после гидролиза 4 М метансульфоновой кислотой в присутствии 0.2% триптамина.

Для очистки с целью определения N-концевой последовательности препарат карбоксипептидазы после Phe-сефарозы фракционировали на приборе для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Pharmacia, LKB, Швеция), используя ионообменную колонку MONO Q в 0.025 М HEPES-буфере, pH 6.2. Сорбированный белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0 → 0.5 М, 1 мл/мин, 25 мин). Затем карбоксипептидазу хроматографировали на Акуароге-колонке (4.6 × 100 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (15 - 60% в 0.1% трифторуксусной кислоте). Белок иммобилизовали на Immobilon P и секвенировали на секвенаторе Knauer 815 (Германия).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, 93/-04-20217.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zwilling R., Jakob F., Bauer H., Neurath H., Enfield D.L. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 94. № 1. P. 223 - 229.
- Titani K., Ericsson L.H., Kumar S., Jacob F., Neurath H., Zwilling R. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 6. P. 1245 - 1250.
- Reeck G.R., Neurath H. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 21. P. 3947 - 3955.
- Gates B.G., Travis G. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 10. P. 1867 - 1884.
- Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Артюков А.А. // Биохимия. 1992. Т. 57. № 1. С. 40 - 45.
- Сахаров И.Ю., Джунковская А.В. // Биохимия. 1993. Т. 58. № 9. С. 1445 - 1453.
- Klimova O.A., Vorukhov S.I., Solovieva N.I., Balaevskaia T.O., Strongin A.Ya. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 166. № 3. P. 1411 - 1420.
- Руденская Г.Н., Степанов В.М., Купенко О.Г., Исаев В.А. // II Всес. совещ. "Биологически активные вещества гидробионтов – новые лекарственные препараты". Тез. докл. Владивосток, 1991. С. 40 - 41.
- Остерман А.Л., Степанов В.М., Руденская Г.Н., Ходова О.М., Цаплина И.А., Яковлева М.Б., Логинова Л.Г. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 2. С. 292 - 299.
- Breddam K., Vazzone T.Y., Holmquist B., Valle B.L. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 8. P. 1563 - 1570.
- Руденская Г.Н., Крейер В.Г., Ландау Н.С., Тарасова Н.И., Тимохина Е.А., Егоров Н.С., Степанов В.М. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 12. С. 2002 - 2008.
- Поляков К.М., Обмолова Г.В., Куранова И.П., Строкопытов Б.В., Вайнштейн Б.К., Мосолова О.В., Степанов В.М., Руденская Г.Н. // Молекуляр. биология. 1989. № 1. С. 266 - 272.
- Folk J.E. // The Enzymes. V. 3. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 57 - 79.
- Prahl J.W., Neurath H. // Biochemistry. 1966. V. 5. P. 4137 - 4142.
- Clauser E., Gardell S.G., Macdonald R.G., Rutter W.J., Craik C.S. // J. Biol. Chem. 1988. V. 23. P. 7837 - 7845.
- Narahashi Y. // J. Biochem. 1990. V. 107. P. 879 - 886.
- Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Gayda A.V., Osterman A.L. // Biochem. and Biophys. Methods. 1981. V. 5. P. 177 - 186.

Isolation and Characterization of a Carboxypeptidase from a Kamchatka Crab *Paralithodes camtschatica*

G. N. Rudenskaya, O. G. Kупenko, V. A. Isaev, V. M. Stepanov, and Ya. E. Dunaevskii

Moscow State University, Chemical Faculty, Department of Chemistry of Natural Products, Vorob'evy Gory, Moscow, GSP-3, V-234, 119899 Russia

Abstract – Homogeneous carboxypeptidase PC from a hematopancreas of kamchatka crab *Paralithodes camtschatica* was obtained by means of an affinity chromatography on sorbents containing arginine, protamine hydrolysate, and phenylalanine as ligands with an yield 23% and purification degree 37.4. The isolated enzyme has a molecular mass 34 kDa, as evidenced by an SDS-PAGE; pI 3.1; an optimum pH 6.5, as estimated for hydrolysis of Dnp-Ala-Ala-Arg; pH-stability range 5 - 8 in the presence of Ca^{2+} ; a temperature optimum 55°C; and K_m 0.4 mM. The carboxypeptidase is activated by Co^{2+} and Ca^{2+} ions and is inhibited by EDTA and *o*-phenanthroline, and therefore, it is a metallo-carboxypeptidase. The enzyme can effectively split off C-terminal residues Phe and Tyr, as well as Arg and Lys. Residues Pro, Glu, and Asp cannot be splitted off, and they stop the cleaving of a preceding bond. Thus, the carboxypeptidase PC of kamchatka crab has a mixed substrate specificity, which is characteristic of carboxypeptidase from crawfish and of microbial carboxypeptidases T and SG. The new carboxypeptidase has an amino acid composition Asp₄₁Thr₂₄Ser₂₂Glu₃₂Pro₁₅Gly₃₂Ala₂₉1/2Cys₅Val₁₉Met₈Ile₁₄Leu₂₀Tyr₁₈Phe₈Lys₇His₄Arg₈Trp₄. The N-terminal sequence of the enzyme demonstrate a 40% homology with the N-terminal sequence of carboxypeptidase from crawfish.

Key words: carboxypeptidase PC, metallo-carboxypeptidase, mixed substrate specificity, isolation.