



УДК 577.156.2

КИСЛАЯ ПРОЛИЛКАРБОКСИПЕПТИДАЗА АДЕНОГИПОФИЗА

Алексеев Л. И., Орехович В. И.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва

Исследовали некоторые свойства частично очищенной пролилкарбоксипептидазы аденогипофиза, активной в слабокислой среде. Очистка включала в себя адсорбцию фермента на DEAE-сефадексе А-50, удаление тиоловых ферментов обработкой сефарозил-4-аминофенил-меркурацетатом. Белки, не связанные этим адсорбентом, были выделены из раствора сульфатом аммония и после обессоливания на сефадексе С-25 использовались в качестве препарата кислой пролилкарбоксипептидазы. Фермент отщепляет С-концевые аминокислотные остатки в пептидах Z-Pro-Phe-OH (K_m 1,5—2,0 мМ), Z-Pro-Ala-OH (K_m 5,5—6,0 мМ), Z-Gly-Pro-Ala-OH (K_m 5,5—6,0 мМ) с максимумом активности при pH 5,0—5,3; 4,1—4,5 и 4,8—5,3 соответственно. Активность фермента угнетается на 80% Z-Gly-CH₂OH и Z-Pro-Gly-CH₂OH и не подавляется металлизывающими, тиолсвязывающими и тиолактивирующими соединениями, а также соевым ингибитором трипсина и пепстатином. Обсуждается вопрос о сходстве обнаруженного фермента с ангиотензиной С из точек.

В водном экстракте аденогипофизов крупного рогатого скота нами обнаружена активность пролилкарбоксипептидазы с pH-оптимумом действия в слабокислой среде [1]. Судя по субстратной специфичности, pH-оптимуму действия и отношению к динизопропилфторфосфату, фермент относится к группе карбоксипептидаз (КФ 3.4.12.4), инактивирующих ангиотензин II [2—5]. Это обстоятельство вызывает особый интерес к этому ферменту, поскольку участвующий в регуляции сосудистого тонуса ангиотензин II в гипофизе и гипоталамусе выполняет роль «рилизинг-фактора», стимулирующего синтез и выделение антидиуретического гормона (вазопрессина) [6—8]. Возможно, что обнаруженная нами пролилкарбоксипептидаза, инактивируя ангиотензин II, регулирует секрецию антидиуретического гормона. Данное исследование посвящено изучению свойств пролилкарбоксипептидазы.

Водный экстракт аденогипофиза и частично очищенный препарат фермента гидролизуют С-концевые связи в α-N-замещенных ди- и трипептидах, у которых остаток пролина преобладает С-концевому остатку. pH-оптимум гидролиза пептидов Z-Gly-Pro-Ala-OH и Z-Pro-Phe-OH лежит при 4,8—5,3. pH-оптимум расщепления Z-Pro-Ala-OH смещен в более кислую область — 4,1—4,5 (рис. 1). Фермент гидролизует также и пептид Z-Gly-Pro-Gly-OH. pH-оптимум его гидролиза составляет 4,5—5,0.

Зависимость скорости гидролиза этих субстратов от концентрации фермента (8—11 мг/мл) имеет линейный характер. Динамика гидролиза во времени также линейна при концентрации препарата фермента 4,4 мг/мл в течение 60—300 мин. Константы Михаэлиса для трех субстратов

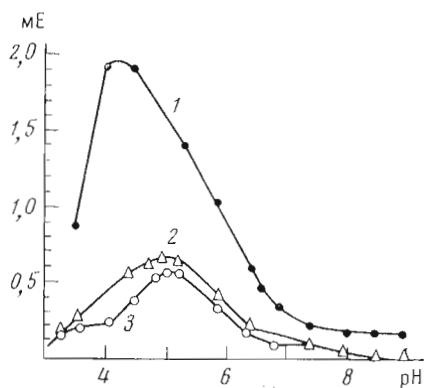


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость активности пролилкарбоксипептидазы от pH в водном экстракте аденогипофиза по субстратам: 1 — Z-Pro-Ala-OH, 2 — Z-Gly-Pro-Ala-OH; 3 — Z-Pro-Phe-OH

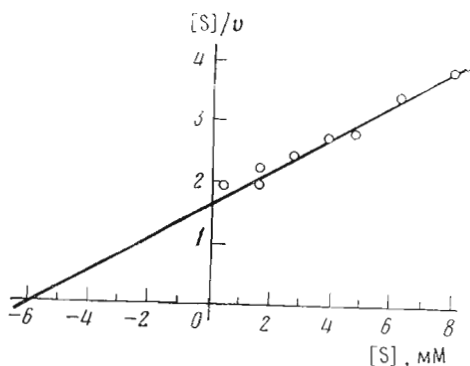


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость $[S]/v$ от $[S]$ для гидролиза Z-Pro-Ala-OH под действием пролилкарбоксипептидазы

(Z-Pro-Ala-OH, Z-Gly-Pro-Ala-OH и Z-Pro-Phe-OH) определены графически по уравнению Лайнуивера и Берка

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V} [S] + \frac{K_m}{V} [9]$$

и для субстрата Z-Pro-Phe-OH оказалась равной 1,5—2,0 мМ, а для Z-Gly-Pro-Ala-OH и Z-Pro-Ala-OH (рис. 2) она имела одинаковое значение и составила 5,5—6,0 мМ.

Как мы уже упоминали в предварительном сообщении, активность кислой пролилкарбоксипептидазы на 70% тормозится диизопропилфторфосфатом [1]. Однако, чтобы отнести фермент к типу «сериновых» протеиназ, необходимо было показать участие остатка гистидина в его каталитическом акте. Хлорметилкетоны α -N-замещенных лизина и фенилаланина, специфические ингибиторы трипсина и хмотрипсина [10], избирательно алкилирующие входящий в их активный центр остаток гистидина, не влияют на активность кислой пролилкарбоксипептидазы. Однако хлорметилкетоны α -N-замещенных глицина и глицил-пролиновых пептидов в значительной степени угнетают ее активность. По предварительным данным, особенно перспективными ингибиторами являются Z-Gly-CH₂Cl и Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl, угнетающие активность на 80%. Мертиолат на активность фермента влияния не оказывает.

Не будучи тиолзависимым ферментом, пролилкарбоксипептидаза не реагирует со специфическим для тиоловых ферментов адсорбентом сефароил-4-аминофенил-меркурацетатом. Это позволяет на ранних этапах очистки отделить этот фермент от щелочной SH-зависимой пролилкарбоксипептидазы. Так же как и тиолаktivирующие реагенты (дитиотреит, 2-меркаптоэтанол, цистеин), на активность фермента не оказывают влияния ионы двухвалентных металлов (Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺), металлсвязывающие соединения (EDTA, O-фенантролин), соевый ингибитор трипсина и пепстатин.

Фермент не стоек. При хранении гипофизов в замороженном состоянии его активность снижается. Наблюдается значительная потеря активности и в процессе выделения. Нестабильность, по-видимому, свойственна некоторым тканевым карбоксипептидазам. Так, Мэллорс [11] сообщает, что катептическая карбоксипептидаза А даже в неочищенном препарате частично теряет свою активность после хранения в течение нескольких ча-

Свойства кислых тканевых карбокси-peптидаз животного происхождения

Фермент	Субстраты	pH-оптимум	K _m , mM	Активаторы	Ингибиторы
Продилкарбокси-peптидаза I из адеино- пифиза крупного рогатого скота	Z-L-Pro-L-Ala-OH Z-Gly-L-Pro-L-Ala-OH Z-L-Pro-L-Phe-OH	4,45-4,5 4,8-5,3 5,0-5,3	5,5-6,0 5,5-6,0 1,5-2,0	-	Z-Cly-SH ₂ Cl, дизопронилфторфосфат
Ангиотензиназа С из лизосом клеток коркового слоя почек свиньи [3]	Vz-L-Pro-L-Phe-OH Z-Gly-L-Pro-L-Phe-OH Z-L-Pro-L-Val-OH Z-L-Pro-L-Tyr-OH Ангиотензин II	5,6-5,8	1,3	-	Дизопронилфторфосфат
Катептическая карбокси-peптидаза С из печени крупного рогатого скота; смесь в высокоочищенном препарате катепсина С [48]; из лизосом печени крыс [47]	Z-L-Pro-L-Phe-OH Ангиотензин II	5,5 5,0-5,5	1,8	-	»
Катепсин А из почек свиньи [43]	Z-L-Gly-L-Phe-OH	3,0-6,0	-	-	Дизопронилфторфосфат, парахлормеркурбензоат
Катепсин А-I из лизосом печени крыс [21]	Z-L-Gly-L-Phe-OH Z-Gly-L-Phe-OH	5,0-5,8 5,0-5,8	1,2 10,0	EDTA, Cl ⁻ , F ⁻ , Br ⁻ , I ⁻	Ag ⁺ , Hg ²⁺
Катептическая карбокси-peптидаза А [14, 14, 45]	Z-L-Gly-L-Tyr-OH	3,5-4,25	-	Тиоловые соединения	Дизопронилфторфосфат, мертиолат
Катепсин В-2, неспецифическая карбо- кси-peптидаза из лизосом печени крыс [16]	Vz-L-Arg-NH ₂ N-замещенные ди- и три- пептиды, кроме пепти- дов пролина	5,5-5,6	10-15	То же	Парахлормеркурбензоат

сов при 0°. Карбоксипептидаза C_N из кожуры цитрусовых стабильна при 0—45° только в узком интервале рН 5,2—5,7; в более кислой или слабощелочной среде быстро денатурирует. Не выдерживает она обессоливания и лиофилизации [12].

Данные, приводимые в таблице, позволяют сравнить свойства пролилкарбоксипептидазы из аденогипофиза и других ранее описанных кислых карбоксипептидаз животного происхождения. Обнаруженный нами фермент по специфичности, рН-оптимуму действия, отношению к диизопропилфторфосфату, отсутствию активаторов близок к ферментам группы карбоксипептидазы С, ангиотензиныазы С и отличается от катептических карбоксипептидаз группы катепсина А или В-2. Из числа испытанных синтетических субстратов большим сродством к пролилкарбоксипептидазе аденогипофиза обладает Z-Pro-Phe-OH. Величина K_m по этому субстрату близка к значениям K_m , полученным для ангиотензиныазы С и катептической карбоксипептидазы С.

Какимото и др. [3], а также Тайлор и Таппел [17] считают, что ангиотензиныаза С из почек, мочи и лейкоцитов [5] и катептическая карбоксипептидаза С из печени крыс и крупного рогатого скота идентичны. Тайлор и Таппел предлагают оставить за ферментом название «катептическая карбоксипептидаза С» как более широкое, поскольку фермент гидролизует не только ангиотензин II. Мы считаем необходимым оставить за ферментом более рациональное, уже внесенное в номенклатуру ферментов название «пролилкарбоксипептидаза» (КФ 3.4.12.4), поскольку оно указывает на природу расщепляемой связи.

Обобщая литературные данные, можно представить себе механизм физиологического действия пролилкарбоксипептидазы в гипофизе и гипоталамусе. Показано, что ангиотензин II, соединяясь со специфическим рецептором на внешних мембранах синтезирующих (гипоталамус) или накапливающих (нейрогипофиз) вазопрессин клеток, приводит в действие специфические механизмы синтеза вазопрессина и выведения его в кровь [8]. Оптимальные условия для образования комплекса ангиотензина II с его рецептором возникают при рН 7,5, а при закислении среды до рН 6 или при защелачивании до рН 8,5 происходит его полная диссоциация [19]. Ангиотензин II, как и всякий полипептидный гормон, будучи связанным с рецептором, не доступен действию протеолитических ферментов [20], но как только происходит диссоциация, гормон ими инактивируется, подвергаясь гидролизу. В слабощелочной и нейтральной среде, когда ангиотензин II связан рецептором, пролилкарбоксипептидаза не действует на гормон, но как только среда закисляется и комплекс диссоциирует, гормон может атаковаться ферментом.

Клеточная локализация пролилкарбоксипептидазы аденогипофиза пока неизвестна, но ангиотензиныаза С является лизосомальным ферментом [4]. И поскольку активация лизосом происходит в слабокислой среде при рН 5—6, вероятно, и диссоциация комплекса, и появление фермента у внешней мембраны клетки связаны с выбросом содержимого лизосом. Такой механизм инактивации ангиотензина II, несмотря на то что он не был никем показан, кажется вполне вероятным. Физиологическая роль пролилкарбоксипептидазы вряд ли исчерпывается инактивацией ангиотензина II. Однако в настоящее время неизвестно, какие именно биологически активные пептиды гидролизует этот фермент в организме.

Экспериментальная часть

Источник фермента. 8 кг аденогипофизов крупного рогатого скота гомогенизировали и экстрагировали двукратным объемом воды в течение 2 ч. Экстракт отделяли от остатков ткани скоростным центрифугированием, разбавляли в 2 раза 0,04 М Трис-НСI-буфером, рН 7,5, и пропускали через систему последовательно соединенных друг с другом 4 делительных

воронки (емкостью 1,5 л каждая), заполненных ДЕАЕ-сефадексом А-50 в том же буфере. Через сефадекс было пропущено 22 л экстракта, содержащего 374 г белка. После промывания сефадекса тем же буфером до полного удаления не связавшихся сефадексом белков активную фракцию элюировали 0,15 М NaCl, концентрацию соли доводили до 0,2 М и полученный раствор (16 л) пропускали через колонку (5 × 40 см) сефарил-4-аминофенил-меркурацетата в меркаптидной форме. Фракция белков, не связавшаяся этим адсорбентом, была высолена сульфатом аммония при 80% насыщения, а фракция белков, связанная адсорбентом, была использована для выделения «коллагеназоподобного» фермента по ранее описанной методике [22]. Сульфатный высол белков был уплотнен до состояния «кейка» на воронке Бюхнера и использовался в качестве препарата пролилкарбоксипептидазы. Все этапы выделения проводили при 4°. Препарат растворяли в воде, обессоливали и переводили в требующийся по условиям опыта буферный раствор с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25. Препарат не гидролизует гемоглобин и субстраты бактериальной коллагеназы, не проявлял пролилкарбоксипептидазной активности в слабощелочной среде. При хроматографии на бумаге препарата, инкубировавшегося как в кислой, так и в щелочной среде, видно множество нингидринположительных соединений, появляющихся в результате автолиза препарата под действием еще не идентифицированных протеиназ.

Субстраты. Z-Gly-Pro-Ala-OH синтезирован В. А. Шибневым (Институт молекулярной биологии АН СССР) [24]. Дипептиды Z-L-Pro-L-Ala-OH и Z-L-Pro-L-Phe-OH синтезированы в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР Е. С. Чаман; они не дают реакции с нингидрином; хроматографически гомогенны.

Определение активности пролилкарбоксипептидазы I. а) Инкубационные смеси. К 0,05 мл раствора фермента в 0,9% NaCl добавляли 0,05 мл 0,3 М ацетатного буфера (рН 5) и 0,05 мл раствора субстрата. В опытах использовали 0,2 мМ водный раствор Z-Gly-L-Pro-L-Ala-OH, 0,15 мМ раствор Z-L-Pro-L-Phe-OH в 50% диметилсульфоксиде и 0,24 мМ водный раствор Z-L-Pro-L-Ala-OH. В последнем случае рН реакционной смеси доводился 0,3 М ацетатным буфером до 4,15. Реакцию останавливали быстрым охлаждением проб до -20°.

б) Хроматография на бумаге. Продукты реакции хроматографировали в системе растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (100 : 10 : 30 по объему) на бумаге Ватман № 1, пропуская растворитель дважды (по 16 ч). В каждую точку наносили по 50 мкл инкубационной смеси. Хроматограммы проявляли 0,5% нингидрином в «забуференном» ацетоне (к 100 мл ацетона добавляли по 1 мл пиридина и уксусной кислоты). Хроматограммы выдерживали 2 ч в темноте при 60°, а затем проявленные соединения экстрагировали 5 мл реагента Бюде [25] в модификации Пасхиной [26]: смесью 220 мл 0,005% раствора сернистой меди и 780 мл 96% этанола.

в) Калибровочные кривые были построены по растворам аланина, фенилаланина и глицина. На хроматограммы было нанесено от 0,02 до 0,25 мкмоль аминокислот в каждую точку. Экстракты проб выдерживали 1 ч в темноте и оптическую плотность измеряли при 510 нм. Опытные пробы измеряли против контрольных «автолизных» проб, инкубационная смесь которых содержала те же компоненты, кроме субстрата. «Автолизные» пробы при проявлении хроматограмм нингидрином в зоне расположения аланина и фенилаланина давали очень слабые пятна.

Действие ингибиторов и активаторов. Растворы фермента (5 мг/мл) смешивали в соотношении 1 : 1 с растворами нижеперечисленных ингибиторов и активаторов в 0,3 М ацетатном буфере, рН 5. В качестве ингибиторов и активаторов были исследованы следующие соединения: Z-Gly-SH₂Cl и Z-Gly-L-Pro-Gly-SH₂Cl (1 мМ; синтезированы в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР), мертиолат (2,7 мМ), О-фенаптро-

лин (2,7 мМ), EDTA (1 мМ), соевый ингибитор трипсина (5 мг/мл), пепстатин (20 мкг/мл в 16% DMSO), 16% раствор DMSO, 2-меркаптоэтанол (0,15 мМ), дитиотреит (1 мМ), $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,22 мМ), MgSO_4 (0,55 мМ), MnCl_2 (0,42 мМ), $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,4 мМ). Время преинкубации с хлорметилкетонами — 4 ч при 20°, а со всеми остальными соединениями — 2 ч при 20°. При определении активности смешивали 0,1 мл преинкубированной смеси и 0,05 мл 0,2 мМ раствора Z-Gly-L-Pro-L-Ala-OH. В случае пепстатина реакцию проводили при pH 4,15 с 0,2 мМ раствором Z-L-Pro-L-Ala-OH в качестве субстрата. Контрольными пробами служили преинкубированные растворы фермента без добавления субстрата и с последующим добавлением его (контроль на «автолиз»). Опытные и контрольные пробы инкубировали 180 мин и хроматографически определяли концентрацию образующегося аланина.

Определение рН-оптимума активности пролилкарбоксипептидазы 1 проводили с 2,3 мг белка/мл при 37° за 240 мин при pH 3,3—5,1 в ацетатных, при pH 5,2—7,7 в ацетат-фосфатных, при pH 5,9—7,6 в фосфатных и при pH 7,4—9,7 в богатых буферных смесях при концентрации солей 0,1 М. Определение K_m проводили в 0,2 М ацетатном буфере, pH 4,15, с 5 мг/мл белка за 140 мин.

Определение содержания белка в препаратах осуществляли по поглощению растворами УФ-света при 260 и 280 нм. Концентрацию рассчитывали по формуле: $[\text{C}] \text{ мг/мл} = 1,45 \cdot D_{280} - 0,74 \cdot D_{260}$ [27]. За единицу пролилкарбоксипептидазы принимали такое ее количество, которое образует 1 мкмоль аланина или фенилаланина за 1 мин. Данные выражали в миллиединицах (МЕ).

Приносим благодарность сотрудникам нашего института Е. С. Чаман и Т. О. Балаевской за предоставление субстратов и ингибиторов, использованных в данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Л. П., Золотов Н. Н., Балаевская Т. О., Орехович В. Н. (1975) Биоорган. химия, 1, 853—855.
2. Yang H. Y. T., Erdős E. G., Chiang T. S. (1968) Nature, 218, 1224—1225.
3. Kakimoto T., Oshima G., Yen H. S. J., Erdős E. G. (1973) Biochim. et biophys. acta, 302, 178—182.
4. Matsunaga M., Saito N., Kira J. (1969) Lap. Circ. J., 33, 545—555.
5. Yang H. Y. T., Erdős E. G., Chiang T. S., Jensem T. A., Rodgers J. G. (1970) Biochem. Pharmacol., 19, 1201—1211.
6. Gagnon D. J., Cousineau D., Boucher P. J. (1973) Life Sci., 12, 487—497.
7. Gagnon D. J., Sirois P., Boucher P. J. (1975) Clin. Exp. Pharm. and Physiol., 2, 305—313.
8. Kurtzman N. A., Boonjarern S. (1975) Nephron, 15, 167—185.
9. Яковлев В. А. (1965) Кинетика ферментативного катализа, с. 42, «Наука», М.
10. Shaw E. (1967) in Methods in Enzymol., XI (Colovick S. P., Kaplan N. O., eds.), pp. 577—586, Acad. Press.
11. Mellors A. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 144, 281—285.
12. Kubota Y., Shoji Sh., Funakoshi T. (1975) J. Biochem., 76, 375—384.
13. Doi E., Kamamura J., Matoba J., Hata T. (1974) J. Biochem., 75, 889—894.
14. Дикчуге Р. А. (1975) Биоорган. химия, 1, 239—246.
15. Дикчуге Р. А., Орехович В. Н. (1975) Биоорган. химия, 1, 845—850.
16. Ninjoor V., Taylor S. R., Tappel A. L. (1974) Biochim. et biophys. acta, 370, 308—321.
17. Taylor S. L., Tappel A. L. (1974) Biochim. et biophys. acta, 341, 99—111.
18. McDonald J. K., Zeitman B. B., Ellis S. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 62—70.
19. Morvan L. P., Palaic D. (1975) J. Pharmacol. and Exp. Ther., 195, 167—175.
20. Kahn S. R., Roth J. (1975) Amer. J. Clin. Pathol., 63, 656—668.
21. Taylor S. L., Tappel A. L. (1974) Biochim. et biophys. acta, 341, 112—119.
22. Алексеев Л. П., Золотов Н. Н., Орехович В. Н. (1976) Биоорган. химия, 2, 942—949.
23. Ellis S. (1960) J. Biol. Chem., 235, 1694, 1699.
24. Шибнев В. А. (1972) Докт. дис. «Синтез регулярных полипептидов и применение их для изучения структуры коллагена», М.

25. Bode F. (1954) *Biochem. Z.*, **326**, 433—435.
26. Пасхина Т. С. (1964) *Современные методы в биохимии*, т. 1, с. 162—180, «Медицина», М.
27. Kalckar U. M. (1974) *J. Biol. Chem.*, **167**, 461—475.

Поступила в редакцию
1.II.1977

После доработки
1.IV.1977

ACID ADENOHYPHYSICAL PROLYLCARBOXYPEPTIDASE

ALEXEENKO L. P., OREKHOVICH V. N.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Acid prolylcarboxypeptidase I was partially purified from homogenized bovine adenohypophysis. The enzyme releases some amino acids from the carboxyl terminus of synthetic peptides having proline residues in the penultimate position. The enzyme has pH optimum at pH 4,1-4,5 for Z-Pro-Pro-Ala-OH, and at pH 4,8-5,3 for Z-Gly-Pro-Ala-OH and Z-Pro-Phe-OH. The K_m is $(1,5-2,0) \cdot 10^{-3}$ M for Z-Pro-Phe-OH and $6,0 \cdot 10^{-3}$ M for Z-Pro-Ala-OH and Z-Gly-Pro-Ala-OH. The enzyme is not affected by chelating, or with thiol-inhibiting and thiol-activating agents, as well as with soybean trypsin inhibitor, pepstatin, and α -N-Tos-phenylalanine and α -N-Tos-lysine chloromethyl ketones. On the other hand, enzymatic activity is abolished on treatment with either diisopropylfluorophosphate or Z-Gly- and Z-Gly-Pro-Gly chloromethyl ketones. According to pH optimum and substrate specificity the enzyme may be identical to angiotensinase C from kidney cortex. The possible physiological role of acid prolylcarboxypeptidase in normal hypothalamo-hypophyseal system is discussed.
