



УДК 577.156.5

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ АКТИВАЦИИ ПРОХИМОЗИНА
И МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ХИМОЗИНА ТЕЛЕНКА*Степанов В. М., Лавренова Г. И., Адли Б.,
Белянова Л. П., Баратова Л. А.**Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Автоматическое определение последовательности аминокислот химозина теленка, выделенного из промышленного препарата с помощью аффинной хроматографии, показало, что при активации прохимозина наряду с главным компонентом, Gly, Leu-химозином, образуется небольшое количество другого компонента, содержащего на N-конце на две аминокислоты меньше, — Val, Leu-химозина. Следовательно, активация прохимозина теленка, так же как и пепсиногена свиньи, протекает неоднозначно и приводит к образованию ферментов с различной длиной полипептидной цепи. Места расщепления полипептидной цепи одни и те же в обоих зимогенах, но относительные количества компонентов различны: пепсин свиньи содержит главным образом компонент с более короткой пептидной цепью, в то время как в химозине преобладает более длинный компонент. Замена лейцина-12 на остаток метионина, обнаруженная для главного компонента, приводит к возникновению еще одной молекулярной формы химозина — Gly, Met-химозина.

В 1962 г. Фольтманн получил данные о наличии по крайней мере двух молекулярных форм у химозина (КФ 3.4.23.4) — молокоствораживающего фермента из сычуга теленка, а также у его предшественника — прохимозина [1]. Впоследствии в этой же лаборатории изучалась первичная структура химозина и прохимозина, однако новых сведений о причинах микрогетерогенности химозина не сообщалось. Применение биоспецифической хроматографии позволяет получить химозин высокой степени чистоты из промышленного препарата сычужного фермента [2]. При исследовании этого препарата методом диск-электрофореза было отмечено присутствие в нем по крайней мере трех молекулярных форм, очень близких по свойствам; указания на микрогетерогенность белка были получены и методом изоэлектрофокусирования. Данные о микрогетерогенности кристаллического химозина теленка были получены Асато и Рэндом [3]. Сеитов и Орунтаева нашли три активных компонента в химозине ягненка [4].

Полученные в данной работе результаты показывают, что микрогетерогенность химозина теленка обусловлена как наличием генетически различных молекулярных форм фермента, так и неоднозначностью процесса активации предшественника.

Применив к химозину теленка автоматическое определение последовательности аминокислот по Эдману, мы нашли, что на N-конце препарат содержит:

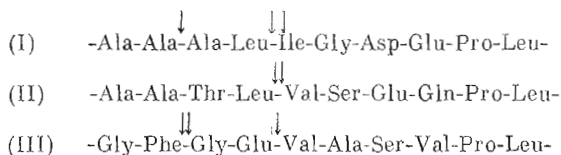
пептидную цепь Gly-Glu-Val-Ala-Ser-Val-Pro-Leu-Thr-Asn-Tyr-Leu-Asp-Ser-Gln-Tyr-Phe- (Gly, Leu-химозин), полностью отвечающую той последовательности, которая была ранее определена для химозина [5];

пептидную цепь такой же структуры, отличающуюся от вышеприведенной (на исследованном участке) лишь заменой остатка лейцина в 12-м положении на метионин (Gly, Met-химозин);

пептидную цепь Val-Ala-Ser-Val-Pro-Leu-Thr-Asn-Tyr-, отличающуюся от последовательности главных компонентов Gly, Leu- и Gly, Met-химозина отсутствием дипептидной последовательности Gly-Glu с N-конца (Val, Leu-химозин).

Обнаружение третьей, укороченной полипептидной цепи — Val, Leu-химозина заслуживает особого обсуждения. Оно показывает, что при активации прохимозина наряду с гидролизом связи Phe-Gly, который приводит к образованию главных компонентов — Gly, Leu- и Gly, Met-химозина — происходит, однако с существенно меньшей вероятностью, расщепление связи Glu-Val. Если первые два компонента длиннее бычьего и свиного пепсина на два аминокислотных остатка, то минорный компонент Val, Leu-химозин точно соответствует по длине N-концевому участку пепсинов. Таким образом, активация прохимозина, точно так же как и активация свиного пепсиногена [6], дает два продукта с различной длиной полипептидной цепи. Радикально различается соотношение этих продуктов: в случае активации свиного пепсиногена продукт с более длинной цепью оказывается минорным, тогда как при активации прохимозина преобладает химозин с более длинной цепью.

На приводимых ниже участках последовательности зимогенов — свиного пепсиногена (КФ 3.4.23.1) (I), бычьего пепсиногена (II) и прохимозина (III) [7] — преимущественно расщепляемые при активации связи показаны двумя стрелками, связи, менее активно атакуемые, — одной:



Полученные результаты еще раз подтверждают сходство процессов активации предшественников пепсина и химозина. Вероятно, преимущественное расщепление связи Phe-Gly, приводящее к образованию Gly-химозинов, обусловлено присутствием остатка фенилаланина, который в большей мере отвечает специфичности химозина, чем остаток глутаминовой кислоты в последовательности Glu-Val. В случае свиного пепсиногена, наоборот, связь Leu-Ile, образованная двумя объемистыми гидрофобными остатками, ближе соответствует специфичности активирующего фермента — пепсина, чем связь Ala-Ala.

По-видимому, расщепление пептидных связей в данном участке последовательности зимогенов диктуется его пространственной доступностью для активирующего фермента, а конкретная точка атаки зависит от того, какие из аминокислотных остатков данного участка отвечают специфичности этого фермента. Такое предположение полностью согласуется с данными о характере активации свиного пепсиногена ферментами, отличающимися по специфичности от пепсина, — металлопротеиназами и эластазой [8]. Свойственная предшественникам карбоксильных протеиназ неоднозначность активации возможна потому, что точное положение освобождающегося при этом аминного конца фермента несущественно для его активности. Отщепляемый при активации этих зимогенов крупный полипептидный фрагмент, видимо, играет роль своеобразного экрана, прикрывающего активный центр фермента.

Обнаруженная нами в химозине замена остатка лейцина-12 (Gly, Leu-химозин) на остаток метионина (Gly, Met-химозин) имеет, очевидно, генетическое происхождение. Пока нельзя определить, обусловлена ли она присутствием аллельного гена (в работе был использован препарат, полученный из сычугов многих животных) или же существованием дуплици-

рованного структурного гена химозина. Возможно, что помимо этой замены в последовательности содержатся и другие, локализованные в иных ее участках. Остаток метионина в 12-м положении, обычно занятом в пепсинах лейцином, найден в гастринсине человека [9] и пепсине лошади [10].

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат химозина теленка, выделенный методом аффинной хроматографии [2]. Определение последовательности аминокислот проводилось при помощи секвенатора фирмы Beckman (США), модель 890, работавшего по белковой программе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Foltmann B. (1962) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 32, 425—444.
2. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Адли К., Гончар М. В., Баладина Г. Н., Славинская М. М., Стронгин А. Я. (1976) *Биохимия*, 41, 294—302.
3. Asato N., Rand A. G. (1971) *Anal. Biochem.*, 44, 32—41.
4. Орунтаева К. В., Сеитов З. С. (1971) *Биохимия*, 36, 18—21.
5. Pedersen V. B., Foltmann B. (1973) *FEBS Lett.*, 35, 250—254.
6. Tang J., Sepulveda P., Marciniyszyn J., Chen K. C. S., Huang W. Y., Tao N., Liu D., Lanier J. P. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 3437—3439.
7. Pedersen V. B., Foltmann B. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 55, 95—103.
8. Stepanov V. M., Baratova L. A., Pugacheva I. B., Belyanova L. P., Revina L. P., Timokhina E. A. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 54, 1164—1170.
9. Sepulveda P., Jackson K. W., Tang J. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 63, 1106—1111.
10. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Руденская Г. Н., Гончар М. В., Лобарева Л. С., Котлова Е. К., Стронгин А. Я., Баратова Л. А., Белянова Л. П. (1976) *Биохимия*, 41, 1285—1290.

Поступила в редакцию
27.IX.1976

AMBIGUITY OF PROCHYMOSIN ACTIVATION AND THE MULTIPLE FORMS OF CALF CHYMOSIN

STEPANOV V. M., LAVRENOVA G. I., ADLY K., BELYANOVA L. P.,
BARATOVA L. A.

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

Automatic sequencing of calf chymosin purified from a commercial preparation by affinity chromatography has revealed that prochymosin activation gives rise to, in addition to the main component (Gly, Leu-chymosin), a small amount of another component which is two N-terminal amino acid residues shorter (Val, Leu-chymosin). Hence, the activation of calf prochymosin, as well as that of swine pepsinogen, appears to be ambiguous process producing the enzymes of different chain length. The sites of polypeptide cleavage are the same in both zymogenes, but the relative quantities of enzyme components are very different: swine pepsin contains mainly the component with shorter peptide chain, whereas the longer one is predominant in calf chymosin. The change of Leu-12 for Met residue found for the main component further increases the multiplicity of calf chymosin molecular forms (Gly, Met-chymosin).