



УДК 577.156.2.024

**СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А: РОЛЬ МЕТАЛЛА АКТИВНОГО ЦЕНТРА
В СПЕЦИФИЧНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ И КАТАЛИЗА***Клесов А. А., Вэлли Б. Л.**Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;**Лаборатория биофизических исследований
Гарвардской медицинской школы, Бостон, Массачусетс, США*

Изучена кинетика реакций гидролиза ряда пептидных и депептидных субстратов, катализируемых Zn^{2+} - и Co^{2+} -карбоксипептидазой. Анализ взаимоотношений между структурой субстратов и их реакционной способностью показал, что участки активного центра, связывающие боковые цепи как первичного, так и вторичного аминокислотного остатка субстратов, имеют гидрофобную природу. Обнаружено явление «кинетического насыщения» в катализе карбоксипептидазой, согласно которому после достижения определенной критической величины гидрофобности субстрата (или размера его боковой цепи), соответствующей этильному заместителю в боковой цепи, величина каталитической константы достигает своей предельной величины и не изменяется при переходе к следующим членам реакционной серии. Этот эффект, как и каталитическую специфичность карбоксипептидазы, можно объяснить вытеснением только одной молекулы воды из гидрофобного «кармана» активного центра фермента в переходном состоянии ферментативной реакции при переходе от глицинового производного к аминокислотным остаткам субстрата с гидрофобной боковой цепью. Показано, что металл в активном центре практически не играет роли ни в специфичности связывания, ни в специфичности катализа карбоксипептидазой А.

Реакции гидролиза сложноэфирных и пептидных субстратов, катализируемые карбоксипептидазой А, отличаются сложной кинетикой. В частности, для катализа карбоксипептидазой А характерно наличие как активации, так и ингибирования ферментативной реакции субстратом [1—4], что затрудняет кинетическую обработку экспериментальных данных [4] и осложняет анализ субстратной специфичности (см. [5, 6]). В ряде работ предлагались эмпирические уравнения для описания кинетического поведения карбоксипептидазы А, но они либо относились к частным случаям кинетики ферментативного действия [7, 8], либо не имели определенного физического смысла (см. [9]).

В настоящей работе излагаются результаты изучения кинетики гидролиза ряда пептидных субстратов, катализируемых карбоксипептидазой А. Цель исследования заключалась, во-первых, в разработке общего кинетического подхода к реакциям, катализируемым карбоксипептидазой А. Во-вторых, представляло интерес изучить топографию активного центра фермента при последовательной вариации структурных заместителей субстратов и выяснить природу участков связывания молекул субстрата, ответственных за ингибирование и активацию ферментативной реакции. Наконец, важным было установить роль металла активного центра кар-

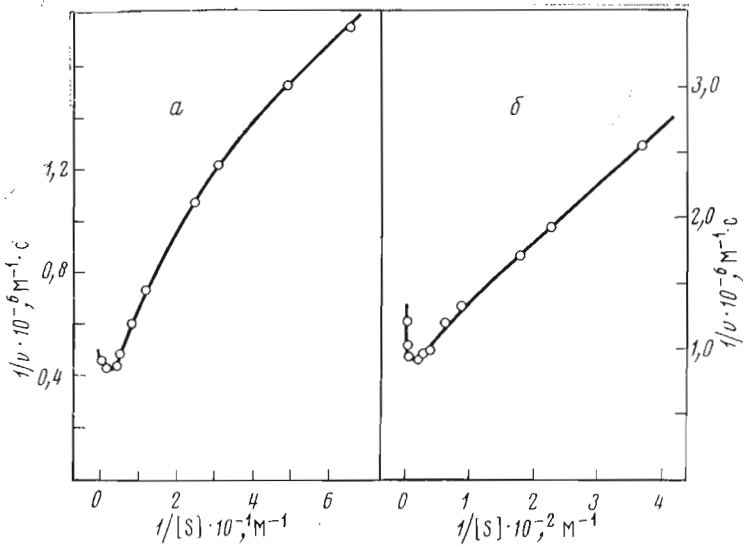
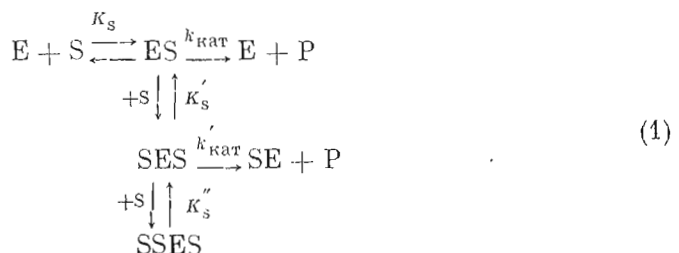


Рис. 1. Гидролиз Z-Gly-Phe (а) и Z-Ala-Phe (б), катализируемый карбоксипептидазой А. Концентрация фермента (М): а — $2,2 \cdot 10^{-8}$, б — $5,4 \cdot 10^{-9}$

боксипептидазы А в определении субстратной специфичности фермента. Этот вопрос до настоящего времени не поднимался в литературе, и исследователи обычно ограничивались определением активности фермента по отношению к тому или иному субстрату после замены иона металла в активном центре. Подход, используемый в настоящей работе, т. е. изучение взаимосвязи между структурой субстрата и его реакционной способностью в изохимическом ряду субстратов (отличающихся, например, вариацией боковой цепи аминокислотного остатка в определенном положении), позволяет в принципе проводить подобные корреляции для металлоферментов, содержащих различные атомы металла в активном центре, и таким образом выявлять роль металла не только в абсолютной активности, но и в специфичности ферментативного действия.

Кинетика реакций гидролиза, катализируемых карбоксипептидазой А. Примером сложного взаимодействия дипептидных субстратов с карбоксипептидазой может служить ферментативный гидролиз Z-Gly-Phe и Z-Ala-Phe (рис. 1). Как видно, в обоих случаях зависимости можно подразделить на три участка: 1) при сравнительно малых концентрациях субстрата кинетика ферментативного гидролиза подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен и зависимость обратной скорости реакции от обратной концентрации субстрата можно аппроксимировать прямой линией; 2) при увеличении концентрации субстрата наблюдается активация ферментативной реакции; 3) при дальнейшем возрастании концентрации субстрата происходит субстратное ингибирование. Таким образом, для гидролиза Z-Gly-Phe и Z-Ala-Phe простейшая схема реакции, катализируемой карбоксипептидазой А, может быть представлена в следующем виде:



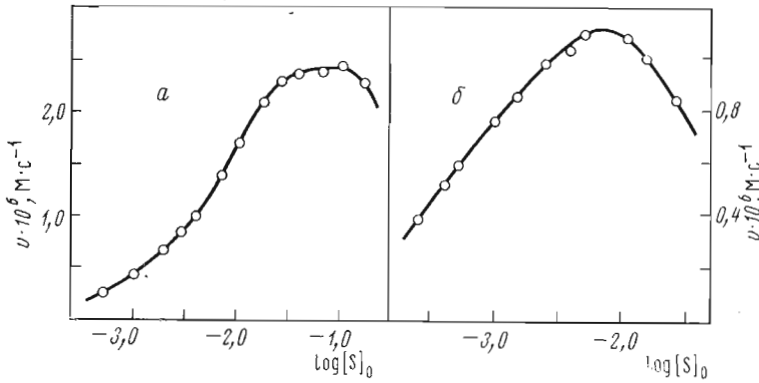


Рис. 2. Активация и ингибирование субстратом в реакциях гидролиза Z-Gly-Phe (а) и Z-Ala-Phe (б), катализируемых карбоксипептидазой А. Кривые (теоретические) рассчитаны на основании уравнения (2) для значений констант: а — $K_m = 2 \cdot 10^{-3}$ М, $k_{кат} = 63$ с $^{-1}$, $K_s' = 3 \cdot 10^{-2}$ М, $k'_{кат} = 190$ с $^{-1}$, $K_s'' = 3 \cdot 10^{-1}$ М для концентрации фермента $2,2 \cdot 10^{-8}$ М; б — $K_m = 4,8 \cdot 10^{-4}$ М, $k_{кат} = 190$ с $^{-1}$, $K_s' = 1,1 \cdot 10^{-2}$ М, $k'_{кат} = 285$ с $^{-1}$, $K_s'' = 3 \cdot 10^{-2}$ М для концентрации фермента $5,4 \cdot 10^{-9}$ М

Согласно данной схеме, первая молекула субстрата, связываясь с ферментом, образует продуктивный фермент-субстратный комплекс (с константой связывания K_s), химическое превращение которого (с образованием продуктов и регенерацией фермента) характеризуется каталитической константой $k_{кат}$. Вторая молекула субстрата, связываясь с активным фермент-субстратным комплексом (с константой связывания K_s'), приводит к увеличению активности тройного комплекса ($k'_{кат} > k_{кат}$). Наконец, связывание третьей молекулы субстрата, происходящее, по-видимому, в непосредственной близости от каталитического участка активного центра фермента (с константой связывания K_s''), блокирует активность карбоксипептидазы А.

Кинетический анализ схемы (1) приводит к следующей зависимости скорости реакции от начальной концентрации субстрата:

$$v = \frac{\left(k_{кат} + \frac{k'_{кат} [S]_0}{K_s'}\right) [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K_s'} + \frac{[S]_0^3}{K_s' K_s''}} \quad (2)$$

Это уравнение количественно описывает кинетические данные для реакций гидролиза пептидных субстратов, катализируемых карбоксипептидазой А. Например, экспериментальные данные для гидролиза Z-Gly-Phe и Z-Ala-Phe, катализируемого карбоксипептидазой А, достаточно хорошо укладываются на соответствующие теоретические кривые (рис. 2), проведенные с использованием уравнения (2). Более того, полученные нами кинетические данные для ферментативного гидролиза 20 пептидных субстратов карбоксипептидазы А (табл. 1—3), также хорошо описываются с помощью уравнения (2) или его частных случаев. Здесь следует подчеркнуть, что с помощью схемы (1) и соответствующего уравнения (2) можно интерпретировать практически все кинетические зависимости для реакций, катализируемых карбоксипептидазой А, которые приводились в литературе. Наконец, фактически все эмпирические уравнения, предлагавшиеся для кинетического описания реакций различных субстратов с карбоксипептидазой А (см., например, [9]), можно рассматривать как частные случаи уравнения (2) и, следовательно, схемы (1).

Таблица 1

Кинетические параметры реакций гидролиза дипептидных субстратов общей формулы Z-Gly-X, катализируемых Zn²⁺-карбоксипептидазой

Субстрат	Константы уравнения Михаэлиса — Ментен		Активация субстратом	
	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$K'_S \cdot 10^3, M$	$k'_{кат}, c^{-1}$
Z-Gly-Phe	2,0	63	30	190
Z-Gly-Norleu	8,1	57	100	115
Z-Gly-Leu	9,5	52	130	130
Z-Gly-Norval	25	65	300	130
Z-Gly-Ala	250	21	>1000	
Z-Gly-Gly	500	0,17		

Таблица 2

Кинетические параметры реакций гидролиза дипептидных субстратов общей формулы Z-X-Phe, катализируемых Zn²⁺-карбоксипептидазой

Субстрат	Константы уравнения Михаэлиса — Ментен		Активация субстратом		Ингибирование субстратом
	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$K'_S \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	
Z-Gly-Phe	2,0	63	30	190	300
Z-Ala-Phe	0,48	190	11	285	30
Z-But-Phe *	0,21	277	Нет активации		24
Z-Norval-Phe	0,069	290	»		18
Z-Norleu-Phe	0,086	277	»		20
Z-Leu-Phe	0,062	122	»		17

* But — α -аминоасляная кислота.

Таблица 3

Кинетические параметры реакций гидролиза трипептидных субстратов общей формулы Z-Gly-Gly-X, катализируемых Zn²⁺- и Co²⁺-карбоксипептидазой

Субстрат	Zn ²⁺ -карбоксипептидаза		Co ²⁺ -карбоксипептидаза	
	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$
Z-Gly-Gly-Phe	0,33	133	0,3	283
Z-Gly-Gly-Norleu	7,1	127	5,0	365
Z-Gly-Gly-Leu	2,9	112	1,8	227
Z-Gly-Gly-Norval	4,5	157	2,6	367
Z-Gly-Gly-Val	12,5	38	—	—
Z-Gly-Gly-Ala	40	11	17	28
Z-Gly-Gly-Gly	150	0,1	100	0,3

Взаимосвязь между структурой субстратов карбоксипептидазы и эффективностью их связывания с активным центром фермента. Серии субстратов, для которых были определены кинетические параметры ферментативного гидролиза, включают карбобензокси-дипептиды с варьирующимися аминокислотными остатками в С-концевом и вторичном положении (Z-Gly-X и Z-X-Phe), N-бензоил-депептиды (сложноэфирные

субстраты) с различной уходящей группой (Bz-Gly-Gly-OX), а также карбо- бензокси-трипептиды с варьирующимися С-концевыми аминокислотными остатками (Z-Gly-Gly-X) (табл. 1—3).

Для количественной характеристики гидрофобности субстратов мы будем использовать константы гидрофобности Ганша для аполярных боковых цепей соответствующих amino- или оксикислотных остатков, структура которых варьируется в данной реакционной серии (рис. 3—5). Если в системе имеет место гидрофобное взаимодействие между активным центром фермента и аполярными фрагментами молекулы субстрата, то при систематическом изменении гидрофобности данных фрагментов согласно принципу линейности свободных энергий должно выполняться соотношение

$$-\log K_s = a\pi + \text{const},$$

где K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, π — константа гидрофобности Ганша для функционального заместителя, варьирующегося в изучаемой субстратной серии [10, 11].

На рис. 3 приведены данные, которые позволяют сопоставить значения констант связывания субстратов с активным центром Zn^{2+} - и Co^{2+} -карбоксипептидазы, с одной стороны, и соответствующие значения констант гидрофобности боковых цепей субстратов — с другой. Так как величины констант Михаэлиса в данном случае равны соответствующим константам диссоциации фермент-субстратного комплекса (см. [12, 13]) и отражают переход молекулы субстрата из воды в окружение активного центра, а константы гидрофобности отражают переход молекулы субстрата (точнее, ее аполярного заместителя) из воды в неводный растворитель, то из приведенного рисунка можно сделать вывод о взаимоотношении между этими двумя процессами. Для всех прямых на рис. 3 значения тангенсов угла

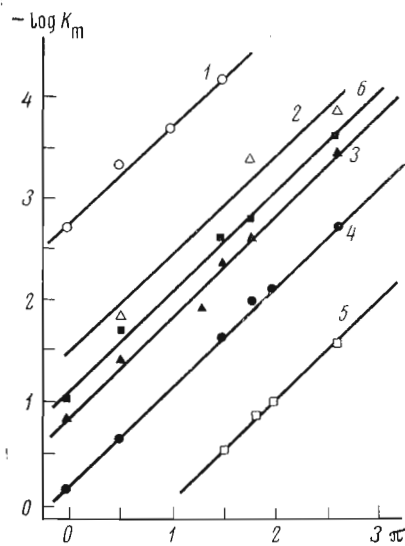


Рис. 3

наклона равны единице; следовательно, участки связывания боковых цепей как первичного (С-концевого), так и вторичного аминокислотного остатка субстратов карбоксипептидазы имеют гидрофобную природу. Таким образом, гидрофобный «карман» активного центра карбоксипептидазы, обнаруженный при

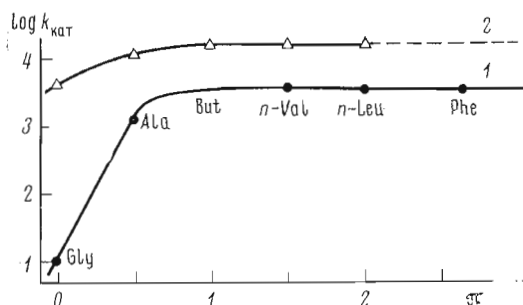


Рис. 4

Рис. 3. Зависимости констант связывания субстратов Z-X-Phe (1), Bz-Gly-Gly-OX (2), Z-Gly-Gly-X (3), Z-Gly-X (4) и Z-Gly-X (5) (константы связывания, K_s' , при активации субстратом) в реакциях гидролиза, катализируемых Zn^{2+} -карбоксипептидазой, и Z-Gly-Gly-X (6) в реакциях Co^{2+} -карбоксипептидазы от констант гидрофобности Ганша для боковых цепей соответствующих аминокислотных или оксикислотных остатков (X) субстратов

Рис. 4. Зависимости каталитических констант реакций гидролиза субстратов Z-Gly-X (1) и Z-X-Phe (2), катализируемых Zn^{2+} -карбоксипептидазой, от констант гидрофобности Ганша для боковых цепей соответствующих аминокислотных остатков (X)

рентгеноструктурном анализе кристаллического фермента [5], участвует в связывании как С-концевого, так и вторичного аминокислотного остатка субстрата. Более того, участок связывания второй молекулы субстрата, дополнительно активирующей ферментативную реакцию (схема 1), также гидрофобен (см. ниже).

При замене иона цинка активного центра карбоксипептидазы А на ион двухвалентного кобальта взаимоотношения между структурой трипептидного субстрата и эффективностью его связывания практически не изменяются (рис. 3). Отсюда можно заключить, что природа металла в активном центре фермента не играет роли в специфичности связывания субстратов карбоксипептидазой А. Другими словами, если ион металла и участвует в связывании пептидного субстрата с ферментом (например, образуя связь с карбонильным кислородом или аминогруппой расщепляемой пептидной связи, см. [4—6, 14, 15]), то эффективность подобного связывания является неизменной в реакционной серии и не зависит от эффективности гидрофобного связывания субстратов с карбоксипептидазой.

Активация и ингибирование субстратом в реакциях, катализируемых карбоксипептидазой А: характер участков связывания. Данные табл. 1 и 2 свидетельствуют о том, что активация субстратом наблюдается для ферментативного гидролиза всех субстратов общей формулы Z-Gly-X, а для гидролиза субстратов Z-X-Phe — только для низших членов ряда, Z-Gly-Phe и Z-Ala-Phe. Кроме того, для субстрата Z-Ala-Phe активация выражена в существенно меньшей степени, чем для Z-Gly-Phe (в первом случае отношение $k'_{кат}/k_{кат}$ равно 1,5, во втором — 3). При дальнейшем увеличении размера боковой цепи во вторичном аминокислотном остатке субстратная активация вообще исчезает (табл. 2). Эти закономерности четко указывают на существование по меньшей мере двух участков связывания в активном центре карбоксипептидазы А, один из которых связывает боковую цепь первичного аминокислотного остатка (уходящей группы), а второй — боковую цепь вторичного остатка и (или) вторую молекулу субстрата, вызывающую активацию (рис. 6). Если «активационный участок» занят объемистой боковой цепью вторичного аминокислотного остатка (например, в случае Z-But-Phe, Z-Leu-Phe, Z-Norleu-Phe и т. д.), вторая молекула субстрата не может связаться по стерическим причинам, и явления субстратной активации не наблюдается (табл. 2). Как следует из рис. 3, участок связывания второй (активирующей) молекулы субстрата имеет гидрофобную природу, так как угловой коэффициент прямой в координатах — $\log K'_s$, π равен единице.

Трипептидные производные (Z-Gly-Gly-X) не обнаруживают активации субстратом (табл. 3). В случае этих субстратов сравнительно протяженная олигопептидная цепь, по-видимому, может «складываться», помещая, например, N-концевую карбобензоксигруппу во вторичный («активационный») гидрофобный участок связывания, в то время как первичный участок занят С-концевым аминокислотным остатком. На подобную картину связывания трипептидного субстрата указывает тот факт, что величины $k_{кат}$ для гидролиза Z-Gly-Gly-X приблизительно равны величинам $k'_{кат}$ (для активации субстратом) в случае субстратов типа Z-Gly-X (см. табл. 1, 3).

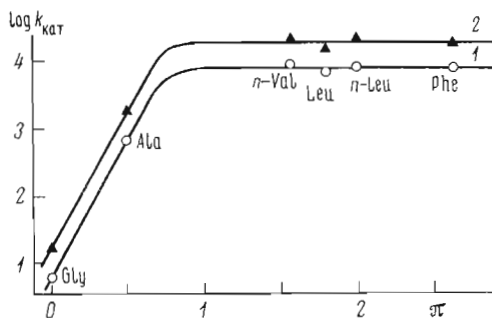


Рис. 5. Зависимости каталитических констант реакций гидролиза субстратов Z-Gly-Gly-X, катализируемых Zn^{2+} - (1) и Co^{2+} -карбоксипептидазой (2), от констант гидрофобности Ганша для боковых цепей соответствующих аминокислотных остатков (X)

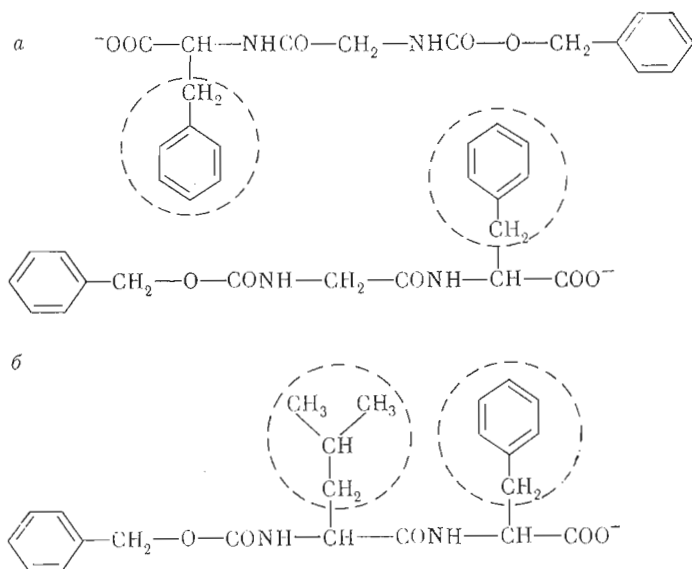


Рис. 6. Схема связывания двух молекул субстрата (на примере Z-Gly-Phe) с активным центром карбоксипептидазы А, приводящего к активации ферментативной реакции субстратом (см. схему 1) (а). Схема двухцентрового связывания субстрата (на примере Z-Leu-Phe) с активным центром карбоксипептидазы А, предотвращающего связывание второй (активирующей) молекулы субстрата (б)

Согласно данным табл. 2, для большинства субстратов серии Z-X-Phe константы субстратного ингибирования примерно равны по величине. Следовательно, участок связывания третьей молекулы субстрата, которая блокирует активность карбоксипептидазы А, не является гидрофобным. Более того, значение константы субстратного ингибирования (K_s'' , схема 1) в случае трипептидного субстрата Z-Gly-Gly-Phe (0,4 М [13]) близко к величине K_s'' для Z-Gly-Phe (0,3 М, табл. 2), хотя значения констант Михаэлиса для этих субстратов различаются в 6—7 раз. По-видимому, величины констант ингибирования субстратом отражают неспецифическое связывание ван-дер-ваальсова типа между каталитическим участком активного центра карбоксипептидазы А и молекулой субстрата, блокирующей ферментативную реакцию.

Взаимосвязь между структурой субстратов карбоксипептидазы А и их реакционной способностью. Для всех серий субстратов в реакциях, катализируемых карбоксипептидазой А (табл. 1—3), величины каталитических констант резко возрастают при переходе от производных глицина к L-аланину и далее к L-аминомасляной кислоте, после чего достигают постоянного уровня (для производных норвалина, лейцина, норлейцина, и фенилаланина, см. рис. 4, 5). По-видимому, при увеличении гидрофобности боковой цепи субстрата и, как следствие, при возрастании эффективности фермент-субстратного взаимодействия происходит постепенная организация активного центра карбоксипептидазы. После достижения определенной критической величины гидрофобности субстрата (или размера его боковой цепи), соответствующей этильному заместителю в боковой цепи субстрата, активный центр карбоксипептидазы достигает своей оптимальной организации (в смысле каталитической эффективности), или «кинетического насыщения», и при переходе к следующим членам реакционной серии, имеющим более гидрофобную боковую цепь и связывающимся более эффективно, дальнейшего ускорения (возрастания $k_{\text{кат}}$) ферментативной реакции не происходит.

С этой гипотезой согласуются данные для ряда Z-X-Phe, первый член которого (Z-Gly-Phe) уже содержит в своем составе гидрофобный остаток

фенилаланина. В этом случае переход от Z-Gly-Phe к Z-Ala-Phe вызывает трехкратное возрастание величины каталитической константы (табл. 2, рис. 4), что соответствует нормальному (1 : 1) отношению между значениями π (для боковых цепей) и $\log k_{\text{кат}}$ для этих двух субстратов, и затем, после субстрата Z-But-Phe, фермент опять достигает «кинетического насыщения» (рис. 4). Эта картина может рассматриваться как пример «триггерного» механизма ферментативной реакции, в котором сравнительно небольшое изменение в структуре субстрата вызывает регенеративный процесс перевода фермент-субстратного комплекса из малоактивной формы (для Z-Gly-Gly) в высокоактивную форму (для Z-Gly-Ala), каталитическая активность которой почти не изменяется при дальнейшем изменении структуры субстрата (рис. 4). Наконец, данную гипотезу можно применить для объяснения эффективности субстратной активации (табл. 1, 2). Из полученных экспериментальных данных следует, что вторая молекула субстрата, связываясь с ферментом и образуя тройной комплекс типа SES (схема 1), увеличивает значение каталитической константы реакций только до определенной степени («кинетическое насыщение») для всех изученных субстратов независимо от их гидрофобности, хотя значения констант связывания для второй (активирующей) молекулы субстрата последовательно улучшаются с увеличением гидрофобности субстрата (рис. 3).

Обнаруженному явлению «кинетического насыщения», или «триггерной модели», в катализе карбоксипептидазой А можно дать следующую физико-химическую интерпретацию. Известно, что стандартная свободная энергия удаления молекулы воды из неводного окружения равна примерно $-2,4$ ккал/моль (при учете в основном энтропийного фактора, см. [16]). Таким образом, если увеличение размера боковой цепи субстрата при переходе от глицинового производного к другим аминокислотным остаткам с гидрофобной боковой цепью приводит к вытеснению только одной дополнительной молекулы воды из гидрофобного «кармана» карбоксипептидазы А в переходном состоянии реакции (помимо нескольких молекул воды, вытесненных при связывании «скелета» субстрата с активным центром фермента, см. [17, 18], число которых может не изменяться для различных субстратов), выигрыш в свободной энергии активации ферментативной реакции может составлять $\sim 2,4$ ккал/моль для гидролиза субстратов, боковая цепь которых превышает соответствующую критическую величину. Как следует из экспериментальных данных, различие в стандартной свободной энергии активации ферментативного гидролиза Z-Gly-Gly и Z-Gly-Ala, катализируемого карбоксипептидазой А, составляет 2,8 ккал/моль. Таким образом, каталитическая специфичность карбоксипептидазы А к субстратам с гидрофобной боковой цепью [19, 20], а также эффект «кинетического насыщения» в катализе карбоксипептидазой А могут быть объяснены вытеснением одной или двух молекул воды из гидрофобного «кармана» активного центра фермента боковой цепью субстрата в переходном состоянии ферментативной реакции. После замены остатка глицина в С-концевом положении на любой другой остаток (L-конфигурации), имеющий гидрофобную боковую цепь, специфичность карбоксипептидазы А переходит главным образом от «кинетической специфичности» к «специфичности связывания». Эта модель находится в соответствии с опубликованными данными рентгеноструктурного анализа карбоксипептидазы А, согласно которым С-концевой аминокислотный остаток молекулы субстрата действительно вытесняет несколько молекул воды из гидрофобного «кармана» активного центра фермента [5, 17, 18].

Так как Co^{2+} -карбоксипептидаза обладает ферментативной активностью, примерно в 2 раза превышающей активность Zn^{2+} -карбоксипептидазы по отношению к некоторым пептидным субстратам [13], представляло интерес выяснить, не ответствен ли атом цинка активного центра фермента за отсутствие линейной корреляции между гидрофобностью субстрата и

значениями каталитических констант ферментативной реакции. В качестве субстратов для данного исследования были выбраны трипептидные производные (табл. 3), не проявляющие кинетических аномалий вплоть до высоких концентраций субстрата [13]. Полученные зависимости, характеризующие взаимосвязь между гидрофобностью субстратов и их реакционной способностью по отношению к Zn^{2+} - и Co^{2+} -карбоксипептидазе, практически идентичны для обоих металлоферментов (рис. 5). Таким образом, природа металла в активном центре карбоксипептидазы А (по крайней мере для Zn^{2+} и Co^{2+}) не играет существенной роли ни в специфичности связывания, ни в специфичности катализа данным ферментом.

Экспериментальная часть

Карбоксипептидаза А, выделенная по методу Ансона, была получена в виде водной суспензии кристаллов от фирмы Worthington Biochemical Corp. (США). Кристаллы промывали водой и растворяли при рН 7,5 (1 М NaCl + 0,05 М Трис-буфер). Запасные растворы фермента хранили при 4°. Все растворы обрабатывали 0,1% дитизоном в четыреххлористом углероде [21] для устранения следов металлов. Стеклянную посуду и пипетки предварительно обрабатывали смесью (1 : 1) азотной и серной кислот и тщательно промывали дистиллированной водой, свободной от следов металлов. Концентрацию карбоксипептидазы А определяли спектрофотометрически при 278 нм, используя коэффициент молярной экстинкции $6,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [22].

Замену металла в Zn^{2+} -карбоксипептидазе на Co^{2+} проводили следующим образом. Кристаллы Zn^{2+} -карбоксипептидазы (10 мг/мл) суспендировали 1 ч в 0,01 М растворе (по каждому компоненту) 1,10-фенантролина и 2-(N-морфолин)этансульфоновой кислоты при рН 7,0 и 25° при перемешивании магнитной мешалкой, промывали 30 мин 0,01 М раствором той же кислоты при рН 7,0. Операции суспендирования и промывания были повторены 4 раза. Полученный кристаллический апофермент содержал ~ 3% остаточного цинка, как было показано методом атомной абсорбционной спектроскопии [23]. Кристаллический апофермент обрабатывали $5 \cdot 10^{-4}$ М $CoSO_4$ (спектрально чистое вещество), трижды промывали 0,01 М раствором 2-(N-морфолин)этансульфоновой кислоты (рН 7,0). Все кинетические эксперименты с использованием Co^{2+} -карбоксипептидазы проводили в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора $CoSO_4$.

Синтетические ди- и трипептидные субстраты (карбобензоксипроизводные) были получены от фирм Cyclo Chemical Corp. и Sigma Chemical Company (США). Деципептидные субстраты Bz-Gly-Gly-OAla, Bz-Gly-Gly-OLeu и Bz-Gly-Gly-OPhe были любезно предоставлены д-ром Д. С. Олдом (Лаборатория биофизических исследований Гарвардской медицинской школы). Все аминокислотные остатки в субстратах, за исключением глицина, L-конфигурации.

Кинетику гидролиза деципептидных субстратов изучали с помощью регистрирующего рН-стата (Radiometer ТТТ-1с, Дания) титрованием щелочью (0,01 н. КОН) образующейся в реакции кислоты. Все эксперименты проводили в токе азота при 25° и ионной силе 0,1 М (KCl) при рН 7,5, используя ячейки объемом 10 или 20 мл. Кинетику гидролиза пептидных субстратов изучали с помощью автоанализатора Technicon, используя модифицированный нингидринный метод [13]. Все опыты проводили при 25°, рН 7,5, в 0,05 М Трис-буфере + 0,05 М KCl, обрабатывали начальные участки кинетических кривых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bazzone T. J., Vallee B. L. (1976) *Biochemistry*, **15**, 868—875.
2. Spilburg C. A., Bethune J. L., Vallee B. L. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3922—3926.
3. Bunting J. W., Murphy J. (1974) *Can. J. Chem.*, **52**, 2640—2647.
4. Auld D. S., Holmquist B. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4355—4361.
5. Ludwig M. L., Lipscomb W. N. (1973) *Inorganic Biochemistry*, vol. 1, pp. 438—487, ed. by G. L. Eichhorn, Elsevier.
6. Vallee B. L., Riordan J. F. (1968) *Brookhaven Symp. Biol.*, **21**, 91—119.
7. Bunting J. W., Myers C. D. (1974) *Can. J. Chem.*, **52**, 2053—2063.
8. Bunting J. W., Murphy J. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1316—1322.
9. Barber A. K., Fisher J. R. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2970—2974.
10. Hansch C., Quinlan J. E., Lawrence G. L. (1968) *J. Org. Chem.*, **33**, 347—350.
11. Hansch C., Coats E. (1970) *J. Pharm. Sci.*, **59**, 731—743.
12. Auld D. S., Latt S. A., Vallee B. L. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4994—4999.
13. Auld D. S., Vallee B. L. (1970) *Biochemistry*, **9**, 602—609.
14. Breslow R., Wernick D. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 259—261.
15. Mock W. L. (1975) *Bioorg. Chem.*, **4**, 270—278.
16. Kauzmann W. (1959) *Advances Protein Chem.*, **14**, 1—63.
17. Lipscomb W. N. (1970) *Accounts Chem. Res.*, **3**, 81—89.
18. Lipscomb W. N. (1972) *Chem. Soc. Rev.*, **1**, 319—336.
19. Abramowitz N., Schechter I., Berger A. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 862—867.
20. Abramowitz-Kurn N., Schechter I. (1974) *Isr. J. Chem.*, **12**, 543—555.
21. Thiers R. E. (1957) *Methods Biochem. Anal.*, **5**, 273—335.
22. Simpson R. T., Riordan J. F., Vallee B. L. (1963) *Biochemistry*, **2**, 616—622.
23. Fuwa K., Pulido P., McKay R., Vallee B. L. (1964) *Anal. Chem.*, **36**, 2404—2411.

Поступила в редакцию
24.XI.1976

SUBSTRATE SPECIFICITY AND KINETICS OF CARBOXYPEPTIDASE A ACTION: ROLE OF A METAL OF THE ACTIVE CENTER IN SPECIFICITY OF BINDING AND CATALYSIS

KLYOSOV A. A., VALLEE B. L.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
Biophysics Research Laboratory, Department of Biological Chemistry,
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA*

The kinetics of hydrolysis of a number of peptide and ester (depsiptide) substrates, catalyzed by zinc (II) and cobalt (II) carboxypeptidase have been studied. The substrate series includes dipeptides with different residues in the penultimate position, ester substrates with varied leaving groups, and tripeptides with different residues in the C-terminal positions. Analysis of interrelationships between the structure of substrates and their reactivities has shown that the active center regions of both zinc and cobalt carboxypeptidase (which bind both C-terminal and penultimate amino acid side chains) are hydrophobic in nature. Reactions catalyzed by carboxypeptidase A exhibit a «kinetic saturation» effect: After a certain degree of hydrophobicity of a substrate side chain is reached, largely determined by that of the ethyl substituent, the catalytic rate constant approaches a limiting value and does not change on further elongation of the substrate. For substrates in which glycine is replaced by progressively more hydrophobic residues this effect is explained based on the displacement of a water molecule from the hydrophobic pocket of the enzyme active center during the transition state of the reaction.