



УДК 577.156.3.02

ЭНТИОСЕЛЕКТИВНОСТЬ ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА ЭФИРОВ АМИНОКИСЛОТ СО СВОБОДНОЙ α -АМИНОГРУППОЙ

Ямсков И. А., Тихонова Т. В., Даванков В. А.

Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва

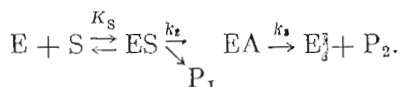
Проведено изучение энантиоселективности химотриптического гидролиза эфиров аминокислот со свободными α -аминогруппами. Показано, что энантиоселективность увеличивается с ростом гидрофобности боковой группы аминокислоты и размеров уходящей спиртовой группы. Переход от эфиров *N*-ациламинокислот к эфирам соответствующих аминокислот со свободной α -аминогруппой приводит к понижению энантиоселективности химотриптического гидролиза эфиров, особенно существенному в случае неспецифических аминокислот (Leu). Возможно, это объясняется сравнительно высокой скоростью гидролиза непротонированной формы *D*-субстрата.

Использование протеолитических ферментов для расщепления рацематов производных аминокислот на оптически активные аминокислоты основано на энантиоселективном гидролизе ферментами субстратов *L*-конфигурации. Однако, как показано на примере химотриптического гидролиза эфиров *N*-ацилпроизводных аминокислот общей формулы $R_1HN-R_2CH-COOR_3$, энантиоселективность не является инвариантной характеристикой ферментов, а зависит от строения групп R_1 , R_2 , R_3 молекулы субстрата [1—5].

В литературе достаточно подробно описано влияние природы боковой группы R_2 . Увеличение гидрофобности этой группы (характеризуемой константой гидрофобности Ганша [6, 7]) в ряду Ala, Val, Leu, Phe, Trp приводит к повышению энантиоселективности химотриптического гидролиза сложнэфирных групп ациламинокислот, причем этот эффект проявляется как

на стадии ацилирования фермента [1, 2] (т. е. на отношении $\frac{k_{кат}^L/K_m^{L(нак)}}{k_{кат}^D/K_m^{D(нак)}}$, равном $\frac{k_2^L/K_s^L}{k_2^D/K_s^D}$), так и на стадии дезацилирования [3] (т. е. на отношении

$\frac{k_3^L/k_3^D}{k_{кат}^L/k_{кат}^D}$, которое в случае эфиров специфических ациламинокислот равно $\frac{k_2^L/k_3^L}{k_2^D/k_3^D}$), где $k_{кат} = k_2k_3/(k_2 + k_3)$, $K_m^{(нак)} = K_s k_3/(k_2 + k_3)$, k_2 , k_3 — каталитические константы скорости стадий ацилирования и дезацилирования соответственно, K_s — равновесная константа диссоциации комплекса Михаэлиса в обычной трехстадийной схеме действия химотрипсина



На стадии ацилирования величина энантиоселективного эффекта зависит также от свойств уходящей спиртовой группы [1].

Инглз и Ноулс [3] объясняют влияние боковой группы R_2 на энантиоселективность химотриптического гидролиза, основываясь на представлениях о трехточечном связывании эфирных и амидных субстратов в активном центре химотрипсина [8]. В соответствии с этой моделью связывание, при котором боковая цепь аминокислоты располагается в гидрофобном «кармане» активного центра фермента, а N-ациламиногруппа фиксируется, образуя водородную связь с карбонильной группой Ser²¹⁴, оказывается продуктивным для субстратов *L*-конфигурации и непродуктивным для субстратов *D*-конфигурации. При таком связывании сложноэфирная группа последних не ориентирована по отношению к каталитически активным группам химотрипсина и эфиры *D*-аминокислот выступают как ингибиторы. Увеличение гидрофобности боковой цепи R_2 , приводя к увеличению степени продуктивного связывания и ускорению гидролиза *L*-субстрата, увеличивает степень непродуктивного связывания эфиров *D*-аминокислот и, следовательно, замедляет их гидролиз, т. е. приводит к повышению энантиоселективности процесса.

На основании данной модели можно предположить, что увеличение гидрофобности N-ацильного заместителя R_1 , незначительно влияя на связывание и скорость химотриптического гидролиза эфиров N-ацил-*L*-аминокислот [9], будет ускорять гидролиз эфиров N-ацил-*D*-аминокислот, так как при продуктивном связывании таких *D*-субстратов N-ацильный заместитель может фиксироваться в гидрофобной полости активного центра фермента. В этом случае рост гидрофобности N-ацильного заместителя должен приводить к уменьшению энантиоселективности химотриптического гидролиза эфиров N-ациламинокислот, что подтверждается данными, полученными в работах [1, 2].

В связи с важной ролью N-заместителя в проявляемой химотрипсином специфичности к субстратам *L*-конфигурации целью данной работы стало исследование энантиоселективности химотриптического гидролиза сложных эфиров аминокислот со свободной α -аминогруппой.

Согласно табл. 1, характер влияния растущей гидрофобности боковой группы R_2 на энантиоселективность химотриптического гидролиза метиловых эфиров аминокислот аналогичен для субстратов со свободной и ацетилированной аминогруппой.

Увеличение гидрофобности R_2 при переходе от Leu к Trp, незначительно влияя на скорость гидролиза эфиров *D*-аминокислот (отношение $k_{кат}^D/K_m^D$ (как) практически одинаково для разных аминокислот), приводит к резкому увеличению отношения $k_{кат}^L/K_m^L$ (как) для эфиров соответствующих *L*-аминокислот (табл. 2). Из табл. 1 следует также, что переход от N-ацилированных субстратов к субстратам со свободной α -аминогруппой приводит к уменьшению энантиоселективности химотриптического гидролиза сложноэфирных групп. Наши данные противоречат высказанному в ряде работ [4, 10—12] мнению об увеличении энантиоселективности химотриптического гидролиза при переходе к субстратам со свободной α -аминогруппой. Основная на предположении, что продуктивному связыванию субстратов *D*-конфигурации будет препятствовать заряженная в условиях реакции α -аминогруппа, эта точка зрения была «подтверждена» экспериментально: при использовании рацемических субстратов — эфиров *D*, *L*-Phe [10] и -Trp [11] — за время полного гидролиза эфира *L*-аминокислоты эфир *D*-аминокислоты практически не гидролизировался (факт вполне объяснимый, если учитывать, что для данных специфических аминокислот скорость гидролиза эфира *L*-аминокислоты на 3—4 порядка выше скорости гидролиза эфира соответствующей *D*-аминокислоты).

Для объяснения пониженной энантиоселективности гидролиза эфиров со свободной α -аминогруппой по сравнению с эфирами N-ациламинокислот следует привлечь данные о влиянии pH на скорость гидролиза эфиров *L*- и *D*-аминокислот. Особенностью гидролиза эфиров аминокислот

Таблица 1

Влияние природы боковой группы R₂ на энантиоселективность химотриптического гидролиза метиловых эфиров аминокислот

Аминокислота	R ₁ =H			R ₁ =CH ₂ CO-[1]
	pH	$\frac{k_{кат}^L}{k_{кат}^D}$	$\alpha \cdot 10^{-3}$	$\alpha \cdot 10^{-4}$
Trp	6,5	$3,2 \cdot 10^4$	26	420
Trp	6,37	$1,3 \cdot 10^4$	15	
Phe	6,5	$2,6 \cdot 10^3$	9,5	42
Phe	6,0	$1,3 \cdot 10^3$	3,5	
Leu	6,5	25**	$9,5 \cdot 10^{-3}$	1,6

$$* \alpha = \frac{k_{кат}^L / K_m^L (\text{как})}{k_{кат}^D / K_m^D (\text{как})}$$

** Приведено отношение $\frac{(v/[E]_0)^L}{(v/[E]_0)^D}$ для [S]₀ 2,5·10⁻² М, меньшей K_m(как).

Таблица 2

Кинетические параметры химотриптического гидролиза метиловых эфиров L- и D-аминокислот со свободной α-аминогруппой

Аминокислота	k _{кат} , с ⁻¹	K _m (как) · 10 ⁴ , М	$\frac{k_{кат}}{K_m(\text{как})}$, М ⁻¹ с ⁻¹
L-Trp	55,7	17	$3,3 \cdot 10^4$
L-Trp*	37,3	7,7	$4,9 \cdot 10^4$
L-Phe**	19,3	134	$1,4 \cdot 10^3$
L-Leu			3,7
D-Trp	$17,4 \cdot 10^{-4}$	14	1,2
D-Trp*	$28,5 \cdot 10^{-4}$	8,5	3,4
D-Phe	$15,0 \cdot 10^{-3}$	370	0,4
D-Leu			0,4

* Данные работы [13]; условия: 25°, pH 6,47 (0,007 М фосфатный буфер), 1,5% ацетонитрила, λ=242,6 нм.

** Данные работы [10]; условия: 25°, pH 6,0 (pH-стат), 0,1 н. NaCl.

со свободной α-аминогруппой является существование субстрата в двух формах: протонированной R₂CH(NH₃⁺)COOR₃ (1) и непротонированной R₂CH(NH₂)COOR₃ (2). Вероятно, обе формы подвергаются ферментативному гидролизу, причем форма (1) L-субстрата должна гидролизироваться значительно быстрее, чем форма (2). Как показано в работе [14], отношение скоростей щелочного гидролиза форм (1) и (2) равно 150. Отношение скоростей реакций, катализируемых ферментом, для этих форм может оказаться большим, так как связывание формы (1) субстрата в активном центре сопровождается при прочих равных условиях образованием значительно более прочной водородной связи его NH₃⁺-группы с карбонильной группой Ser²¹⁴ фермента по сравнению с водородной связью NH₂-группы субстрата (2) с той же карбонильной группой фермента. Это приводит к термодинамически более благоприятному связыванию формы (1) L-субстрата в активном центре фермента по сравнению с формой (2) и, следовательно, к большей скорости ферментативного гидролиза формы (1) субстрата.

В pH-оптимуме гидролиза эфиров L-аминокислот со свободной α-ами-

Таблица 3

Влияние природы уходящей группы $-OR_3$ на энантиоселективность химотриптического гидролиза эфиров фенилаланина со свободной α -аминогруппой

R_3	$\frac{k_{кат}^L/K_m^L(как)}{k_{кат}^D/K_m^D(как)} \cdot 10^{-3}$	$\frac{(v/[E]_0)^L}{(v/[E]_0)^D} \cdot -$	pK_a эфиров [10]
Me	3,5	1,5	7,15
Et	15,8	4,9	7,23
Pr ⁱ	51,2	12,1	7,26

* Концентрация L - и D -субстрата $4 \cdot 10^{-2}$ М.

Таблица 4

Кинетические параметры химотриптического гидролиза эфиров D - и L -Phe- OR_3

Энантиомер	R_3	$k_{кат}, c^{-1}$	$K_m(как) \cdot 10^3, M$	$\frac{k_{кат}}{K_m(как)}, c^{-1} M^{-1}$	$v/[E]_0^*, c^{-1}$
D	Me	$15 \cdot 10^{-3}$	37	0,4	$1 \cdot 10^{-2}$
L^{**}	Me	19,3	13,4	$1,4 \cdot 10^3$	
D	Et			$8,0 \cdot 10^{-2}$	$0,3 \cdot 10^{-2}$
L^{**}	Et	20,1	16,5	$1,2 \cdot 10^3$	14,2
D	Pr ⁱ			$2,0 \cdot 10^{-2}$	$0,1 \cdot 10^{-2}$
L^{**}	Pr ⁱ	15,8	18,2	$0,9 \cdot 10^3$	10,9

* $v/[E]_0$ определено для концентрации субстрата $4 \cdot 10^{-2}$ М.

** Данные работы [10].

ногруппой (рН 5,5—6,5) [4, 10, 12, 13, 15, 16] субстрат существует преимущественно в форме (1) (pK использованных в данной работе эфиров аминокислот 7,15—7,64 [14]). Увеличение рН приводит к возрастанию относительного количества формы (2) и, следовательно, к уменьшению скорости гидролиза эфиров L -аминокислот. Напротив, скорость гидролиза D -субстрата в форме (2) может оказаться выше скорости гидролиза протонированной формы (1), так как при связывании радикала R_2 в гидрофобной «полости» активного центра фермента незаряженная α -аминогруппа, не обладающая выраженным сродством к образованию водородной связи с Ser²¹⁴, не препятствует ориентации сложноэфирной группы субстрата в направлении каталитически активных групп фермента. Кроме того, продуктивно связыванию D -субстрата соответствует также ориентация незаряженной NH_2 -группы субстрата в направлении гидрофобной «полости» активного центра фермента. Действительно, как показано в работе [13], рН-профиль каталитической константы скорости гидролиза метилового эфира D -Тр сдвинут в более щелочную область по сравнению с соответствующим рН-профилем для L -субстрата (рН-оптимумы при 8,0 и 6,5 соответственно).

Таким образом, участие в процессе гидролиза непротонированной формы (2) D -субстрата приводит к снижению энантиоселективности взаимодействия химотрипсина с эфирами аминокислот со свободной аминогруппой. Это снижение особенно существенно в случае неспецифических аминокислот (например, Leu), боковой радикал которых обладает малым сродством к гидрофобной полости активного центра фермента, что резко снижает скорость гидролиза L -субстрата, но в меньшей степени влияет на скорость гидролиза D -субстрата (табл. 2).

Исследование влияния уходящей группы $-OR_3$ на энантиоселективность химотриптического гидролиза эфиров аминокислот со свободной α -аминогруппой (на примере Phe) показало, что энантиоселективность увеличивается при переходе от метилового эфира к этиловому и далее к изопропиловому (табл. 3). Как вытекает из табл. 4, такая тенденция вызвана уменьшением скоростей гидролиза и специфических констант ($k_{кат}/K_{m(каж)}$) эфиров D -ряда при практически постоянном значении этих параметров в случае L -энантиомера. Уменьшение скорости гидролиза эфиров D -аминокислот, вероятно, можно объяснить как увеличением pK_a эфиров при переходе от метилового к изопропиловому (табл. 3), так и возрастающими стерическими препятствиями уходящих спиртовых групп, если предположить, что стадией, лимитирующей скорость реакции, при pH 6,0 в случае гидролиза эфиров D -аминокислот является стадия ацилирования химотрипсина.

Экспериментальная часть

α -Химотрипсин (кристаллический препарат Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова) растворяли в 10^{-3} н. HCl и хранили в холодильнике. Концентрацию активного химотрипсина в препарате определяли титрованием n -нитрофениловым эфиром триметилуксусной кислоты [17].

Субстраты — хлоргидраты метиловых эфиров D - и L -Тгр, D - и L -Phe, D - и L -Leu, а также этиловый эфир D -Phe и изопропиловый эфир D -Phe синтезировали по методике, предложенной в работе [18]. Чистоту полученных препаратов контролировали методом ТСХ на силуфоле.

Кинетику ферментативного гидролиза изучали при помощи регистрирующего рН-стага (Radiometer TTT-1с, Дания) в водных растворах при ионной силе 0,1 (KCl) и $20-25^\circ$. Постоянное значение рН в системе поддерживали добавлением в ячейку (объемом 10 мл) 0,01 н. КОН. Кинетические параметры гидролиза эфиров получали обработкой в координатах Лайнуивера — Берка зависимостей начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата в условиях $[S]_0 \gg [E]_0$. Так как pK_a аминогрупп субстратов на 2 единицы ниже pK_a аминогрупп продуктов, при изучении кинетики вводили соответствующую поправку (см., например, [10]). Все результаты были получены при значениях рН 6,0—6,7, поэтому возможность транспептидации не учитывали, поскольку в работе [19] показано, что этот эффект проявляется в заметной степени лишь при значениях рН, превышающих pK_a α -аминогруппы субстрата.

Для количественной характеристики энантиоселективности химотриптического гидролиза использовали отношение констант специфичности

$$\frac{k_{кат}^L/K_{m(каж)}^L}{k_{кат}^D/K_{m(каж)}^D} \text{ и отношение каталитических констант } k_{кат}^L/k_{кат}^D.$$

Кроме того, в ряде случаев использовали отношение $(v/[E]_0)^L/(v/[E]_0)^D$, полученное при одном значении концентрации субстрата в рН-оптимальном гидролиза эфиров соответствующих L -аминокислот. Выбор этого значения рН, неоптимального для энантиоселективности (которая увеличивается с уменьшением рН [13]), объясняется тем, что уменьшение рН вызывает быстрое уменьшение абсолютных скоростей гидролиза эфиров как L -, так и D -аминокислот, затрудняя кинетические эксперименты.

Гидролиз метиловых эфиров D - и L -Тгр изучали при рН 6,5, так как из полученных нами результатов следует, что рН-оптимум гидролиза метилового эфира L -Тгр равен 6,3—6,5, что совпадает с данными, приведенными в работе [13].

Кинетические параметры гидролиза метиловых эфиров D - и L -Leu определяли при рН 6,5, близком к установленному нами рН-оптимальному гидролиза метилового эфира L -Leu, равному 6,7. Исследование рН-зависимостей кинетических параметров гидролиза метилового эфира L -Leu показа-

ло, что для всех значений рН рабочий интервал концентраций субстрата существенно ниже $K_{m(\text{каж})}$, что дало возможность получить лишь отношение кинетических констант $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$. Интересно, что рН-зависимость кинетических констант имеет вид перевернутого колокола с минимумом при рН 6,0—6,1. Увеличение рН выше 6,5 приводит к быстрому росту отношения $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$.

Кинетические параметры гидролиза эфиров Phe были определены при рН 6,5 и 6,0, так как рН-оптимум гидролиза метилового эфира L-Phe равен 6,0—6,5 [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Dupaix A., Bechet J. J. (1973) FEBS Lett., 34, 185—188.
2. Silver M. S., Matta M. S. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 151, 62—67.
3. Ingles D. W., Knowles J. R. (1967) Biochem J., 104, 369—377.
4. Клесов А. А. (1972) Канд. дис. «Взаимосвязь структуры и реакционной способности субстратов α -химотрипсина», МГУ.
5. Pattabiraman T. N., Lawson W. B. (1972) Biochem. J., 126, 645—657.
6. Hansh C., Coats E. (1970) J. Pharm. Sci., 59, 731—745.
7. Leo A., Hansh C., Elkins D. (1971) Chem. Rev., 71, 521—616.
8. Hein G. E., Niemann C. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 4487—4494.
9. Березин И. В., Мартинок К. (1977) в кн.: Физико-химические основы ферментативного катализа, с. 138, «Высшая школа», М.
10. Purdue J. E., Benoiton N. L. (1971) Can. J. Biochem., 48, 1058—1065.
11. Tong J. H., Petitcherc C., D'Iorio A., Benoiton M. L. (1971) Can. J. Biochem., 49, 877—881.
12. Клесов А. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1512—1522.
13. Kezdy F. J., Jindal S. D., Bender M. L. (1972) J. Biol. Chem., 247, 746—752.
14. Hay R. W., Porter L. J., Morris P. J. (1966) Austr. J. Chem., 19, 1197—1205.
15. Del Castillo L. M., Nieto J., Arce E., Inei-Shizukawa G., Crus M. T., Castanêda-Agulló M. (1971) Biochim. et biophys. acta, 235, 358—369.
16. Johnson P. E., Stewart J. A. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 149, 295—306.
17. Bender M. L., Bequé-Cantón M. L., Blakeley R. L., Brubacher L. J., Foder J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killheffer J. V., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 5890—5913.
18. Erlanger B. F., Sashe H., Brand E. (1954) J. Amer. Chem. Soc., 76, 1806—1810.
19. Seydoux F. (1970) Eur. J. Biochem., 17, 207—217.

Поступила в редакцию
26.VI.1978

ENANTIOSELECTIVITY OF THE CHYMOTRYPSIN CATALYZED HYDROLYSIS OF AMINO ACID ESTERS BEARING UNSUBSTITUTED α -AMINO GROUP

YAMSKOV I. A., TIKHONOVA T. V., DAVANKOV V. A.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Enantioselectivity of the chymotrypsin catalyzed hydrolysis of the amino acid esters having free α -amino group has been studied. The more hydrophobic are the amino acid side chains and more bulky leaving alkoxy groups, the higher is the enantioselectivity. The use of free instead of N-acyl amino acid esters results in the decrease in enantioselectivity, which is especially marked with non-specific amino acids like leucine. As an explanation of this finding, the relatively high hydrolysis rate of the D-substrates with non-protonated amino group is invoked.