



УДК 577.152.34'21.14'1

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ СЕРИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА
BACILLUS BREVIS — БЛИЗКИЙ АНАЛОГ СУБТИЛИЗИНА
BPN'

Калёбина Т.С., Рыженкова В.В., Кулаев И.С.,
Руденская Г.Н., Ходова О.М., Честухина Г.Г.,
Степанов В.М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический и химический факультеты

Методом аффинной хроматографии на биоспецифических сорбентах бацитрацинохроме и фенолборонат-сефарозе из культуральной жидкости *Bacillus brevis* штамм 5/1, выделена сериновая протеиназа, гомогенность которой была подтверждена диск-электрофорезом в полиакриламидном геле при pH 6,5. Фермент полностью инактивируется ингибиторами сериновых протеиназ — фенолметилсульфонилфторидом, утиным овомукоидом и ингибитором из *Actinomyces janthinus*. pH-оптимум фермента 7,5–9,0; температурный оптимум 40–50°С, молекулярная масса 28 000, pI 8,6.

Фермент гидролизует Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, не активен по отношению к Vz-Arg-pNA.

По аминокислотному составу (Lys 9, His 5, Arg 2, Asx 33, Thr 13, Ser 35, Glx 18, Pro 15, Gly 37, Ala 39, Val 29, Met 4, Ile 8, Leu 15, Tyr 10, Phe 5, Trp 3) и последовательности 21 аминокислотного остатка с N-конца полипептидной цепи протеиназа *B. brevis* близка к субтилизину BPN' (*B. amyloliquefaciens*). Иммунологически изучаемый фермент отличается от субтилизина BPN'.

Внеклеточные сериновые протеиназы, образуемые некоторыми видами бацилл, родственными *Bacillus subtilis*, так называемые субтилизины, относятся к числу наиболее изученных протеолитических ферментов [1, 2]. Установлены первичная и пространственная структуры ряда из них, строение каталитического центра, основные черты механизма действия. Эти ферменты образуют особое семейство эволюционно родственных сериновых протеиназ субтилизинового типа [2], однако именно эволюционные соотношения внутри этого семейства до последнего времени далеки от выяснения. Еще в 1952 г. работами Э. Смита и сотрудников было показано, что субтилизины BPN' и Карлсберг, образуемые, как предполагалось в то время, двумя штаммами одного вида бацилл — *B. subtilis*, очень значительно — примерно одной третьей частью общего числа аминокислотных остатков — различаются по первичной структуре. Это интерпретировалось как пример удивительно высокого темпа эволюционной изменчивости белка [3]. В дальнейшем, выяснилось, что субтилизин BPN' синтезируется *B. amyloliquefaciens*, а субтилизин Карлсберг — *B. licheniformis* [4]. Протеолитические ферменты, химически близкие, но не идентичные двум наиболее изученным субтилизинам, секретируются несколькими другими штаммами бацилл, видовая принадлежность которых не всегда очевидна. Высказывались предположения о существовании двух типов сериновых протеиназ: типа BPN' и Карлсберг [5]. Недавно было показано, что секреторная сериновая протеиназа *B. thuringiensis* относится к особому подсемейству субтилизинов — тиолзависимым протеиназам [6].

Для рода *Bacillus* характерен целый набор внеклеточных сериновых протеиназ, более или менее существенно отличающихся друг от друга по структурным и функциональным характеристикам [3–6].

Данная работа посвящена выделению и химической характеристике внеклеточной сериновой протеиназы *B. brevis* — вида, протеиназы которого ранее не изучались.

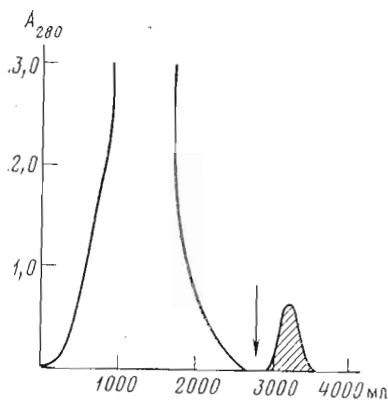


Рис. 1

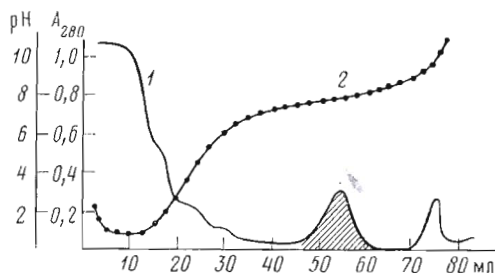


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография сериновой протеиназы из *B. brevis* (126 000 OE_{280}) на колонке (1,5×30 см) с бацитрацин-силохромом в 50 мМ трис-НСI-буфере, pH 8,2, содержащем 1 мМ $CaCl_2$; стрелкой отмечено начало элюции 1 М NaCl в том же буфере. Заштрихован пик, отвечающий активной фракции

Рис. 2. Изоэлектрофокусирование фермента из *B. brevis* после его хроматографии на бацитрацин-силохроме в градиенте pH 5–10: 1 — A_{280} ; 2 — pH. Заштрихован пик, в котором после реактивации обнаруживалась активность

Культуральная жидкость *B. brevis* штамм 5/4 обладает протеолитической активностью, определяемой по синтетическому субстрату сериновых протеиназ *n*-нитроанилиду бензилоксикарбонилаланил-аланил-лейцина (I) и по казеину. Для первой стадии выделения из культуральной жидкости соответствующей протеиназы мы воспользовались биоспецифическим сорбентом — бацитрацин-силохромом, который ранее успешно применялся для очистки различных протеиназ микробного происхождения [7–9]. Бацитрацин содержит ряд остатков гидрофобных аминокислот, которые способствуют образованию им фермент-субстратного комплекса со многими протеиназами, и является для многих из них конкурентным ингибитором. В то же время присутствие *D*-изомеров аминокислот делает его устойчивым к действию большинства протеолитических ферментов [10].

В результате аффинной хроматографии на бацитрацин-силохроме удельная активность фермента возросла в 257 раз (по *n*-нитроанилиду (I)) (табл. 1, рис. 1), выход фермента по активности составил 100%. Как показало изоэлектрофокусирование, полученный в результате этой операции препарат содержит единственную протеиназу с *pI* 8,6, а также некоторое количество белковых примесей с *pI* ниже 4,0 (рис. 2).

Таблица 1

Очистка протеиназы из *E. brevis* *

Операция	Содержание белка, OE_{280}	Активность				Выход по активности, %		Степень очистки, <i>n</i> раз	
		суммарная, ед. акт.		удельная, ед. акт./ OE_{280}		А	Б	А	Б
		А	Б	А	Б				
Культуральная жидкость	12 600	37,8	100,8	0,003	0,008	100	100	—	—
Хроматография на бацитрацин-силохроме	49	38,1	80,5	0,770	1,640	100	80	257	205
Хроматография на фенолборонат-сефарозе	12,4	37,3	66,8	3,20	5,4	98	66	1002,3	675,6

* Активность измеряли по *Z*-Ala-Ala-Leu-pNa (I) (А) и по казеину (Б).

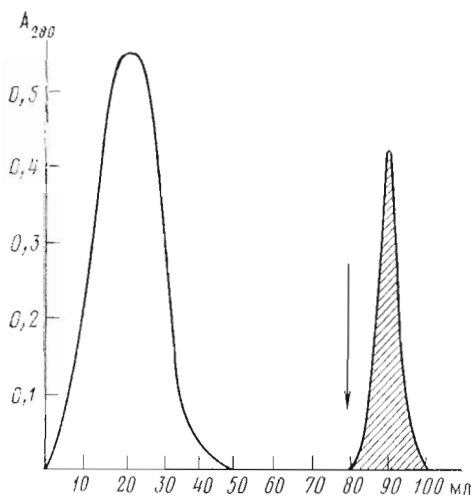


Рис. 3

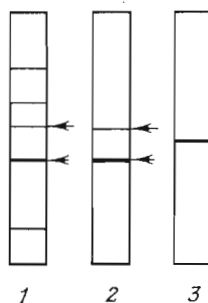


Рис. 4

Рис. 3. Хроматография сериновой протеиназы из *B. brevis* (заштрихованный пик рис. 1) на колонке (1×15 см) и фенолборнат-сефарозой в триэтиламин-карбонатном буфере, рН 8,2; стрелкой отмечено начало элюции 0,5 М трис-НСI-буфером, рН 9,0, содержащим 1 мМ СаСI₂. Заштрихован пик, отвечающий активной фракции

Рис. 4. Схема электрофореза в полиакриламидном геле препаратов белка после хроматографии на бацитрацин-силохроме (1) и фенолборнат-сефарозе (2); 3 — электрофорез препарата после фенолборнат-сефарозы в присутствии додецилсульфата натрия. Стрелками указаны зоны, проявляющие активность

Для дальнейшего выделения фермента мы применили аффинный сорбент — фенолборнат-сефарозу. Ингибирующее действие фенолборной кислоты и других замещенных борных кислот на протеолитические ферменты типа субтилизина основано, с одной стороны, на взаимодействии органического радикала с гидрофобной зоной связывания фермента, а с другой — на образовании ковалентного комплекса борной кислоты с каталитическим участком активного центра фермента [11–13]. На этой стадии очистки выход активного фермента составил 98% (табл. 1, рис. 3). По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и диск-электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 4), препарат практически не содержит примесей. Этот фермент и был использован для дальнейших исследований.

Изучение субстратной специфичности дало следующие результаты: фермент расщепляет казеин, обнаруживая при рН 8,2 удельную активность 5,4 ед. акт./ОЕ₂₈₀, он гидролизует также *n*-нитроанилиды трипептидов — специфические субстраты субтилизинов. Следует отметить, что удельная активность фермента по отношению к *n*-нитроанилиду (1) примерно в 10 раз выше, чем к *n*-нитроанилидам *N*-бензилоксикарбонильным производным глицил-глицил-лейцина и аланил-глицил-лейцина; следовательно, активность фермента зависит от природы аминокислот, предшествующих атакуемой ферментом связи. Фермент не проявляет активности по трипсиновому субстрату *n*-нитроанилиду *N*-бензоиларгинина.

Фермент не имеет четко выраженного оптимума рН протеолитического действия как по казеину, так и по синтетическому субстрату (1) (рис. 5). Температурный оптимум действия фермента находится в пределах 40–50° С (рис. 6).

Молекулярная масса секретируемой внеклеточной сериновой протеиназы *B. brevis*, определенная методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, составила 30 000, причем по электрофоретической подвижности фермент совпадает с субтилизином ВРН'. Эта величина молекулярной массы несколько превышена по сравнению с известной для субтилизина ВРН' величиной (28 000), что, возможно, связано с особенностями поведения данной белковой молекулы в условиях электрофореза.

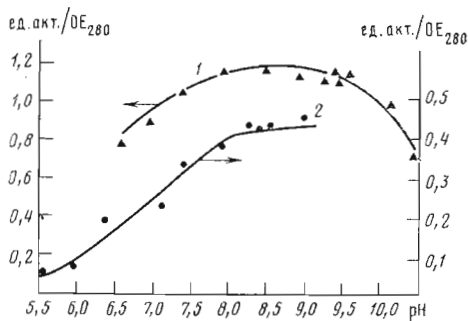


Рис. 5

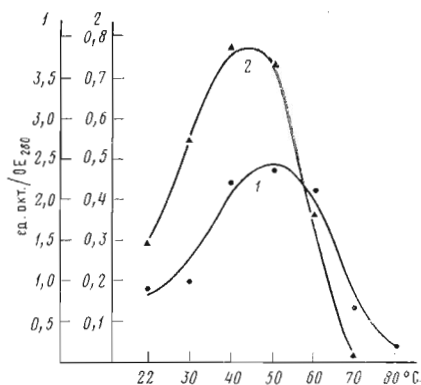


Рис. 6

Рис. 5. pH-Зависимость активности фермента из *B. brevis* по казеину (1) и Z-Ala-Ala-Leu-pNA (2)

Рис. 6. Температурная зависимость фермента из *B. brevis* по казеину (1) и Z-Ala-Ala-Leu-pNA (2)

Японские авторы, применив тот же метод, также нашли для молекулярной массы субтилизина BPN' завышенную величину 30 500 [14]. Определение молекулярной массы гель-фильтрацией на сефадексе G-75 также дало одинаковые результаты для изучаемой протеиназы и субтилизина BPN' — 21 000. Такая величина явно занижена, видимо, вследствие того, что оба фермента, будучи щелочными белками, сорбируются на матрице сефадекса G-75 (ср. [15]) даже в присутствии относительно высоких концентраций солей. Для окончательного вывода о молекулярной массе протеиназы *B. brevis* особенно важно, что этот фермент при использовании двух принципиально разных методов — гель-фильтрации и электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия — вел себя точно так же, как и субтилизин BPN', которому он близок по энзиматическим и структурным (см. ниже) характеристикам. Отсюда можно предположить, что молекулярная масса изучаемого фермента совпадает с молекулярной массой субтилизина BPN' (28 000) и что его молекула, как и молекула субтилизина BPN', представляет собой единичную полипептидную цепь. С учетом аминокислотного состава (см. ниже) молекулярная масса протеиназы *B. brevis* составляет 27 926.

Протеиназа из *B. brevis*, как и субтилизин BPN', полностью инактивируется фенолметилсульфонилфторидом (PMSF), а также ингибитором из *Actinomyces janthinus* и утиным овомукоидом.

Имеются некоторые различия в поведении этих двух ферментов на фенолборонат-сефарозе. В то время как субтилизин BPN' подобно другим сериновым протеиназам не сорбируется, а только несколько задерживается на этом сорбенте, отставая от балластных белков [16], фермент из *B. brevis* прочно с ним связывается (см. рис. 3). Поскольку во взаимодействии с лигандом принимает участие активный центр фермента, можно ожидать некоторых различий в структуре или микроокружении активных центров этих двух ферментов.

Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что сравниваемые ферменты очень сходны по изученным физико-химическим свойствам. Исключение составляет только достаточно выраженная инактивация фермента из *B. brevis* в присутствии EDTA.

Аминокислотный состав изучаемого фермента в целом похож на аминокислотный состав секреторных сериновых протеиназ бацилл: уровень содержания дикарбоновых кислот и их амидов составляет в молекуле белка примерно 15%, фермент не содержит цистеина и цистина (табл. 3). При сравнении с двумя наиболее исследованными субтилизинами BPN' и Карлсберг видно, что фермент из *B. brevis* в этом отношении ближе к субтилизину BPN': заслуживает упоминания разница между ними лишь в

Некоторые свойства протеиназы из *B. brevis* штамм 5/4 и субтилизина BPN'

Свойства	Протеиназа из <i>B. brevis</i>	Субтилизин BPN'
Активность по Z-Ala-Ala-Leu-pNA (I), ед. акт./OE ₂₈₀	3,0	3,0
pH-Оптимум активности	7,0-9,0	8,0-10,0
Остаточная активность, % после действия:		
PMSF (6 моль/моль)	0,0	0,0
ингибитора из <i>Act. janthinus</i> (1 моль/моль)	0,0	0,0
утиного овомуконда (1 моль/моль)	0,0	0,0
EDTA, 10 мМ, 30 мин, 20° С	30,0	90,0
Молекулярная масса	28 000	28 000 *
Изоэлектрическая точка	8,6	8,3 [17]

* Вычислена нами из аминокислотного состава (см. табл. 3).

Таблица 3

Аминокислотный состав субтилизиннов *

Аминокислота	BPN'	5/4	CAR	AMY	221	SFE	PFI	FIR	BTH	72
Lys	11	9	9	8	6	7	11	4	11	11
His	6	5	5	6	8	5	4	6	5	4
Arg	2	2	4	4	8	7	4	6	6	2
Asp	28	33	28	25	29	43	28	23	33	30
Thr	13	13	19	17	18	24	17	14	21	19
Ser	37	35	32	41	23	33	31	22	27	36
Glu	15	18	12	15	16	18	15	14	24	17
Pro	14	15	9	13	16	9	14	12	12	11
Gly	33	37	35	33	39	39	29	30	32	25
Ala	37	39	41	35	45	45	32	32	37	36
Val	30	29	31	25	27	20	22	21	24	27
Met	5	4	5	4	4	3	5	2	1	-
Ile	13	8	10	16	9	21	9	7	14	12
Leu	15	15	16	15	22	16	23	16	12	15
Tyr	10	10	13	12	9	17	9	6	15	10
Phe	3	5	4	4	2	3	4	2	3	2
Trp	3	3	1	3	3	4	-	-	5	-
Cys	0	0	0	0	0	2	0	-	1	0
Всего	275	280	274	276	284	316	247	217	283	257

* Использованы следующие сокращения для субтилизиннов (здесь приведены также соответствующие литературные источники): BPN' — субтилизин BPN' (*B. amyloliquefaciens*) [18], CAR — Карлсберг (*B. licheniformis*) [18], AMY — субтилизин *Amy. osacchariticus* (*B. amylosacchariticus*) [19], 221 — субтилизин 221 (*Bacillus* № 221) [20]; SFE — субтилизин *Sfericase* (*B. sphaericus*) [21], PFI — субтилизин Pfizer (*B. subtilis* Pfizer) [22], FIR — субтилизин *Firmus* (*B. firmus*) [23], BTH — субтилизин *B. thuringiensis* [6], 72 — субтилизин *B. subtilis* штамм 72 [16].

содержании лизина, гистидина и в особенности изолейцина. По сравнению с субтилизинном Карлсберг, в частности, можно отметить довольно существенные различия в содержании треонина, глутаминовой кислоты, пролина, тирозина и триптофана. Впрочем, сходство аминокислотного состава сериновой протеиназы *B. brevis* и субтилизина BPN' при всей его значимости не следует переоценивать, поскольку в достаточно крупных белках компенсирующие друг друга аминокислотные замены могут маскировать большие различия в первичной структуре. Например, различие в составе субтилизиннов BPN' и Карлсберг на ~30% само по себе не дает оснований предполагать, что эти два фермента различаются заменой примерно трети аминокислотных остатков.

Более существенно сравнение аминокислотных последовательностей белков. Определенная нами автоматическим методом Эдмана первичная структура N-концевого участка фермента, содержащего 21 аминокислотный остаток (см. схему), оказалась отчетливо гомологичной соответствующим участкам первичной структуры субтилизинов. Особенно интересно, что на этом участке последовательности протеиназы *B. brevis* и субтилизина BPN' полностью совпадают. В то же время при сравнении с последовательностью субтилизина Карлсберг обнаруживаются на том же участке 10 аминокислотных замен. Столь разительное отличие с несомненностью указывает на то, что внеклеточная сериновая протеиназа *B. brevis* структурно очень близка субтилизину BPN' и в то же время значительно отличается от субтилизина типа Карлсберг.

Аминокислотная последовательность N-концевых фрагментов субтилизинов [16,19] *

	5	10
5/4	Ala-Glx-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Val-Ser-Glx-	
BPN'	Ala-Glx-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Val-Ser-Glx-	
AMY	Ala-Glx-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Ile-Ser-Glx-	
CAR	Ala-Glx-Thr-Val-Pro-Tyr-Gly-Ile-Pro-Leu-	
72	Ala-Glx-Thr-Val-Pro-Tyr-Gly-Ile-Pro-Leu-	
	15	20
5/4	He-Lys-Ala-Pro-Ala-Leu-His-Ser-Glx-Gly-Tyr-	
BPN'	He-Lys-Ala-Pro-Ala-Leu-His-Ser-Glx-Gly-Tyr-	
AMY	He-Lys-Ala-Pro-Ala-Leu-His-Ser-Glx-Gly-Tyr-	
CAR	He-Lys-Ala-Asx-Lys-Val-Glx-Ala-Glx-Gly-Phe-	
72	He-Lys-Ala-Asx-Lys-Val-Glx-Ala-Glx-Gly-Tyr-	

* Сокращенные обозначения субтилизинов см. в табл. 3.

Совпадение N-концевой последовательности не означает, конечно, полного структурного сходства. Следует обратить внимание на то, например, что субтилизин *B. brevis* штамм 72, близкий к субтилизину Карлсберг, по все же определенно отличающийся от него, по аминокислотной последовательности почти совпадает с этим ферментом, отличаясь лишь 21-м остатком. Точно так же, одной аминокислотной заменой на N-концевом участке, различаются и субтилизин BPN', и субтилизин из *B. amylosacchariticus*, полные первичные структуры которых разнятся 31 остатком. Вероятные структурные различия субтилизина BPN' и сериновой протеиназы *B. brevis* подтверждается также некоторыми различиями их свойств, в частности различным отношением к EDTA, разными изоэлектрическими точками, а также различающимся поведением на фенилборонат-сефарозе. Однако наиболее существенным подтверждением таких различий следует считать отсутствие взаимодействия фермента из *B. brevis* с антисывороткой к субтилизину BPN'.

Таким образом, внеклеточная сериновая протеиназа *B. brevis* по своим структурным и функциональным характеристикам должна быть отнесена к семейству субтилизинов (КФ 3.4.21.14). Внутри этого семейства просовываются отдельные группы структурно (и, видимо, эволюционно) близких ферментов. Так, к субтилизину Карлсберг *B. licheniformis* близок субтилизин *B. subtilis* штамм 72. Другую группу образуют субтилизин BPN', продуцируемый *B. amyloliquefaciens*, субтилизин *B. amylosacchariticus* и исследованная нами внеклеточная сериновая протеиназа *B. brevis*. Гораздо более отличается от этих двух групп субтилизинов внеклеточная сериновая протеиназа *B. thuringiensis* [6], относящаяся, по-видимому, к особому подсемейству субтилизинов — тиолзависимым сериновым протеиназам.

Экспериментальная часть

Фермент выделяли из культуральной жидкости *B. brevis* штамм 5/4. Посевной материал выращивали 72 ч при 30° С на твердой питательной среде, содержащей 2% агара и 0,4% клеток дрожжей рода *Candida*. Куль-

туру *B. brevis* выращивали при 30° С в течение 72 ч в колбах при объеме среды культивирования 250 мл на качалках (280 об/мин). Среда культивирования содержала: 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,4% сухих дрожжей рода *Candida*, 0,2 М Na-фосфатный буфер, рН 6,4.

Протеолитическую активность фермента определяли по расщеплению казеина [24], а также синтетических субстратов сериновых протеиназ — *n*-нитроанилидов бензилоксикарбонил-аланил-аланил-лейцина (I), бензилоксикарбонил-аланил-глицил-лейцина и бензилоксикарбонил-глицил-глицил-лейцина [25]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях определения гидролизует за 1 мин 1 мкмоль субстрата. Удельную активность выражали в ед. акт./ОЕ₂₈₀, где ОЕ — величина оптического поглощения раствора фермента при 280 нм. Возможность гидролиза *n*-нитроанилида бензоил-*D,L*-аргинина, специфического субстрата трипсина, определяли по методу [26].

Бацитрацин-силохром [27] синтезировали по следующей методике: к 1,6 г бацитрацина (Serva, Англия) прибавляли 320 мг *n*-бензохинона в 50 мл диметилформамида (при перемешивании). Через 1 ч добавляли 10 г аминсилохрома (Олайне), содержащего 120 мкмоль NH₂-групп/г, осторожно перемешивали в течение 3 ч. Затем сорбент отфильтровывали, промывали диметилформамидом, водой (до исчезновения поглощения при 257 нм) и высушивали на воздухе. По данным аминокислотного анализа (образец гидролизovali 5,7 н. HCl 48 ч при 105° С), сорбент содержал 15 мкмоль лиганда на 1 г сухого образца. Избыток аминогрупп, оставшихся незамещенными, ацетилировали 1,5 мл уксусного ангидрида в 100 мл хлористого этилена при 20° С с перемешиванием, добавляя триэтиламин для связывания выделяющейся кислоты.

Для очистки фермента использовали также фенилборонат-сефарозу, синтезированную по методу [28], и сефадекс G-75 (Pharmacia, Швеция).

Выделение сериновой протеиназы B. brevis штамм 5/4. Культуральную жидкость (1 л, рН 6,5) с уд. акт. 0,003 ед. акт./ОЕ₂₈₀ (здесь и далее приведена активность по субстрату (I)) наносили на колонку (30×1,5 см) с бацитрацин-силохромом, уравновешенным 50 мМ трис-HCl-буфером, рН 8,2, содержащим 1 мМ CaCl₂ (рис. 1). После промывки стартовым буфером элюцию проводили 1 М NaCl, приготовленным на том же буфере. Полученный раствор фермента с уд. акт. 0,77 ед. акт./ОЕ₂₈₀ диализовали против 0,01 М триэтиламин-карбонатного буфера, рН 8,2, содержащего 1 мМ CaCl₂, и наносили на колонку (15×1 см) с фенилборонат-сефарозой (см. рис. 3). После промывки стартовым буфером активный фермент элюировали 0,5 М трис-HCl-буфером, рН 9,0, содержащим 1 мМ CaCl₂. Полученный раствор фермента с уд. акт. 3,2 ед. акт./ОЕ₂₈₀ диализовали против 50 мМ трис-HCl-буфера, рН 8,2, содержащего 1 мМ CaCl₂, и лиофильно сушили.

Изоэлектрофокусирование препарата фермента, полученного после очистки на бацитрацин-силохроме, проводили по методу Вестерберга и Свенсона [29] на колонке объемом 110 мл (ЛКВ, Швеция). Градиент рН создавали с помощью смеси амфолинов 5–10, используя градиент концентрации сахарозы 60–5%. Опыт продолжали 48 ч при 4° С и мощности тока 5 Вт. На колонку наносили 50 мг белка, предварительно обработанного фенилметилсульфонилфторидом (см. ниже). Для идентификации пика активности (объем белковых фракций 2 мл) проводили реактивацию фермента формгидроксамовой кислотой [30].

Для определения рН-оптимума протеолитического действия фермента его раствор (1 мг/мл) в 50 мМ трис-HCl-буфере, рН 8,2, разбавляли в 50 раз и определяли удельную активность по *n*-нитроанилиду (I) и казеину при 40° С. Использовали 0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1–7,9), 0,2 М трис-HCl-буфер (рН 7,2–9,0) и 0,2 М глициновый буфер (рН 8,6–10,0).

Для определения температурного оптимума раствор фермента (1 мг/мл) в 50 мМ трис-HCl-буфере разбавляли в 50 раз и определяли протеолитическую активность при различных температурах.

Ингибирование фенилметилсульфонилфторидом (Serva) проводили по методу [31], прибавляя двумя равными порциями с интервалом 30 мин 1% раствор ингибитора в абсолютном диоксане к раствору фермента (кон-

центрация 1 мг/мл) с таким расчетом, чтобы получить мольное соотношение фермент — ингибитор 1 : 6. Реакцию с белковым ингибитором из *Actinomyces janthinus* * [32] и утиным овомукоидом (Sigma) проводили в том же буфере при мольном соотношении фермент — ингибитор 1 : 1. Остаточную протеолитическую активность измеряли через 30 мин, используя в качестве субстратов *n*-нитроанилид (I) и казеин.

Молекулярную массу фермента (образец после ингибирования фенилметилсульфонилфторидом) определяли методом гель-фильтрации на колонке (1×14,5 см) с сефадексом G-75 в 0,5 М трис-HCl-буфере, pH 8,2. Свободный объем колонки измеряли по выходу голубого декстрана с молекулярным весом (M_r 2 000 000). В качестве маркеров использовали миоглобин (12 400), химотрипсиноген (25 000), пепсин свиньи (35 500), яичный овальбумин (45 000), бычий сывороточный альбумин (68 000). Калибровочный график зависимости молекулярного веса от объема элюента имеет линейную форму в логарифмической шкале.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу Лемли [33], используя образец фермента после ингибирования фенилметилсульфонилфторидом**.

Аминокислотный состав определяли после гидролиза фермента 5,7 н. HCl в вакууме при 105°С в течение 48 ч на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США). Триптофан определяли после гидролиза метансульфоновой кислотой [34], метионин и полуцистин — по методу Мура [35].

N-Концевую последовательность аминокислот определяли на секвенаторе Beckman-890 (США).

Реакцию двойной иммунодиффузии в геле по Оухтерлони проводили в 1% агарозе с 0,9% NaCl, pH 7,3. В центральную лунку помещали кроличью антисыворотку к субтилизину BPN'. В периферические лунки вносили раствор субтилизина BPN' или фермента из *B. brevis* штамм 5/4 (20, 10 и 5 мкг).

ЛИТЕРАТУРА

1. Keay L. IV Intern. Ferm. Symp.: Fermentation Technology Today. N. Y., 1972, p. 289—298.
2. Markland F. S., Smith E. I. In: Enzymes. N. Y.—London: Acad. Press, 1971, p. 561—608.
3. Dayhoff M. O. D-111 Natl. Biomed. Res. Foundation, Silver Spring, USA, 1969.
4. Keay L., Moser P. W., Wildi B. S. Biotechnol. Bioeng., 1970, v. 12, № 2, p. 213—217.
5. Keay L., Moser P. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, v. 34, № 5, p. 600—604.
6. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan I. S., Osterman A. U., Khodova O. M., Belyanova L. P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 100, № 4, p. 1680—1687.
7. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N. U. S. Patent № 4, 100, 028, 11 July, 1978; British Patent № 153386. 9 June 1977.
8. Степанов В. М., Лобарёва Л. С., Руденская Г. Н., Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Лавренова Г. Н. Биооргани. химия, 1977, т. 3, № 6, с. 831—835.
9. Изотова Л. С., Городецкий Д. И., Янонис В. В., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Тимохина Е. А., Стронгин А. Я., Степанов В. М. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 397—403.
10. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Янонис В. В., Остославская В. И., Гончар М. В., Котлова Е. К., Стронгин А. Я. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1256—1263.
11. Koehler K. A., Lienhard G. E. Biochemistry, 1971, v. 10, № 13, p. 2477—2483.
12. Lindqvist R. N., Terry C. Arch. Biochem. and Biophys., 1974, v. 160, № 1, p. 135—144.
13. Matthews D. A., Alden R. A., Birktoft J. J., Freer S. T., Kraut J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 18, p. 7120—7125.
14. Matsubara H., Nishimura S. J. Biochem. (Tokyo), 1958, v. 45, № 6, p. 413—416.
15. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова И. Г., Куприянова Т. И., Хохлова Ю. М., Усайге Н. А., Логинова Л. Г., Тимохина Е. А. Биохимия, 1980, т. 45, № 10, с. 1871—1879.
16. Акпаров В. Х., Белянова Л. Г., Баратова Л. А., Степанов В. М. Биохимия, 1979, т. 44, № 5, с. 886—891.
17. Svensson B. FEBS Lett., 1973, v. 29, № 2, p. 167—169.

* Ингибитор был любезно предоставлен Д. А. Черменским.

** Условия диск-электрофореза в полиакриламидном геле будут опубликованы в отдельном сообщении.

18. Smith E. L., De Lange R. J., Evans W. H., Landon M., Markland F. S. J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 9, p. 2184–2191.
19. Kurihara M., Markland F. S., Smith E. L. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 17, p. 5619–5631.
20. Nakamura K., Matsushima A., Horikoshi K. Agr. Biol. Chem., 1973, v. 37, p. 1261–1267.
21. Yoshida K., Hidaka H., Miyado S., Shibata U., Saito K., Yamada Y. Agr. Biol. Chem., 1977, v. 41, p. 745–755.
22. Munelly K. P., Kapoor A. Int. J. Peptide and Protein Res., 1976, v. 8, № 2, p. 141–153.
23. Nijenhuis B. T. 1978, Patent of UK 50044/74, 26.7.
24. Каверзнева Е. Д. Прикл. биохим. и микробиол., 1971, т. 7, № 2, с. 225–232.
25. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 273–279.
26. Erlanger B. F., Kokowsky N., Gohen W. Arch. Biochem. and Biophys., 1961, v. 95, № 2, p. 271–278.
27. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Gaida A. V., Osterman A. L. J. Biochem. Biophys. Meth., 1981, v. 5, № 3, p. 177–186.
28. Акпаров В. Kh., Stepanov V. M. J. Chromatogr., 1978, v. 155, № 2, p. 329–336.
29. Vesterberg O., Swensson H. Acta. chem. scand., 1966, v. 20, № A10, p. 820–822.
30. Хижинборгом В. Реакции органических соединений. М.: Химическая литература, 1939. с. 256.
31. Vemitsu N., Sugiyama M., Matsumiga H. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 258, № 2, p. 562–565.
32. Андреева Н. А., Черменский Д. Н., Грищенко В. М. Тез. докл. II Всес. совещ. по ферментам микроорганизмов, 1978, ч. 1, с. 140.
33. King J., Laemmli U. K. J. Mol. Biol., 1971, v. 62, № 3, p. 465–473.
34. Moore S. In: Chemistry and Biology of Peptide, Ann. Arbor. Published, Michigan: 1972, p. 629–653.
35. Moore S. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 1, p. 235–237.

Поступила в редакцию
22.XI.1982
После доработки
10.I.1983

EXTRACELLULAR SERINE PROTEINASE FROM *BACILLUS BREVIS* — AN ANALOG OF SUBTILISIN BPN'

KALEBINA T. S., RYZHENKOVA V. V., KULAEV I. S., RUDENSKAYA G. N.,
KHODOVA O. M., CHESTUKHINA G. G., STEPANOV V. M.

*Biology and Chemistry Departments, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

A serine proteinase has been isolated in a homogeneous state from the cultural filtrate of *Bacillus brevis* by affinity chromatography on bacitracin-silochrom and phenylboronate-Sepharose. Its proteolytic activity was completely suppressed by inhibitors of serine proteinases: phenylmethylsulphonyl fluoride, the inhibitor from *Actinomyces janthinus* and duck ovomucoid. The optimum pH and temperature ranges are 7.5–9.0 and 40–50° C, respectively. Molecular weight is equal to 28 000, *pI* — 8.6. The enzyme cleaves Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, and shows no activity towards Bz-Arg-pNA. The amino acid composition of this proteinase is very similar to that of the serine proteinase from *Bacillus amyloliquefaciens* (subtilisin BPN'): Lys 9, His 5, Arg 2, Asx 23, Thr 13, Ser 35, Glx 18, Prc 18, Pro 15, Gly 37, Ala 39, Val 29, Met 4, Ile 8, Leu 15, Tyr 10, Phe 5, Trp 3. The N-terminal amino acid sequence is identical throughout 21 residue to that of BPN'. The proteinase from *B. brevis* strain 5/4 does not show crossreaction with antiserum against subtilisin BPN' when tested by immunodiffusion technique.