

М. М. БОТВИНИК и С. М. АВАЕВА

О ГИДРОЛИЗЕ О-АЦИЛАМИНОАЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СЕРИНА (О-ПЕПТИДОВ) ФЕРМЕНТАМИ

(Представлено академиком А. Н. Несмеяновым 9 IV 1952)

В литературе неоднократно высказывались предположения о существовании в молекуле белка или системах белков эфирной связи ⁽¹⁾. Но эти предположения не были подтверждены экспериментом.

В последнее время было показано, что трипсин, химотрипсин и карбоксипептидаза способны расщеплять не только амидную, но и эфирную связи ⁽²⁾. Объектами исследования были метиловые и этиловые эфиры N-ацилированных аминокислот. Лишь в одном случае, на примере этилового эфира N-бензоил-О-(бензоилфенилаланил)-серина, авторы изучали гидролиз О-пептидной связи и пришли к отрицательным результатам. Следует отметить, что авторы проводили свои исследования в разрезе изучения специфичности химотрипсина, а не реакционной способности эфирной (О-пептидной) связи.

Мы полагаем, что изучение наряду с амидообразной других возможных форм связи в белке и системах белков имеет существенное значение для разрешения вопроса о строении и функциональных особенностях белков.

В связи с этим нами были разработаны условия синтеза и синтезированы N, О-ациламиноацильные производные серина и его эфира (в дальнейшем мы их называем О-пептидами серина) и изучено их отношение к ферментам.

Гидролиз указанных в табл. 1 соединений проводился панкреатином и кристаллическим трипсином. За ходом гидролиза следили по изменению рН раствора. Через определенные промежутки времени к растворам добавлялась 0,1 N NaOH до первоначальной величины рН. рН среды устанавливался потенциометром со стеклянным электродом (ЛП4). Результаты исследования представлены на рис. 1 и 2.

В отличие от результатов Кауфмана и Нейрата, полученных в опытах с этиловым эфиром N-бензоил-О-(бензоилфенилаланил)-серина ⁽²⁾, мы нашли, что О-пептиды серина легко расщепляются по эфирной связи. Скорость расщепления панкреатином и трипсином примерно одинакова. За первый час гидролиз достигает приблизительно 40%. В отсутствие фермента степень распада не превышает 2—3%. Скорость ферментативного расщепления наибольшая в первые часы гидролиза, затем быстро затухает. При прибавлении свежей порции фермента скорость гидролиза вновь резко увеличивается.

Расщепление О-пептидной связи серина щелочью возрастает с повышением рН среды. Так, N-бензоил-О-(бензоилфенилаланил)-серин гидролизуется при рН 8 за 200 мин. на 5%, а при рН 10 за 60 мин. на 25%. Прибавление фермента резко повышает степень распада. Это также служит доказательством расщепления О-пептидных связей ферментами.

Опыты по расщеплению эфиров О-пептидов, N-пептидов и N-ацильных производных серина не привели к положительным результатам.

Синтез О-пептидов серина

Таблица I

Соединение	Синтез		Т. пл. в о	Дей- ствие форм.	
	Ф ор м у л а	1-й компонент			2-й компонент
N, O-(диацетилфенил- аланил)-серин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{NHCOCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{OSOCNH}_2\text{NHCOCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH} = \text{C} - \text{CO} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	103-105	+
N-бензил-O-(бензил- фенилаланил)-серин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{OSOCNH}_2\text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CHCOCl} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CONH} \end{array}$	171	+
Изопропиловый эфир N, O-дифталилаланил- серина	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{C}_3\text{H}_7 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{C}_3\text{H}_7 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \cdot \text{HCl} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{COCl} \end{array}$	171	
Этиловый эфир N-(бензил-O-(изо- бутириламино)-се- рина	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{OSOC}(\text{CH}_2)_2\text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2 - \text{C} = \text{C} - \text{CO} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	129	-
Этиловый эфир N-бен- зил-O-(бензилфе- нилаланил)-серина	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{OSOCNH}_2\text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NHCOCH}_2\text{N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2\text{CHCOCl} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{CONH} \end{array}$	152	-

Этиловые эфиры N-бензоил-(O-изобутириламино)-серина и N-бензоил-O-(бензоилфенилаланил)-серина, изопропиловые эфиры N-фталилглицил- и N-бензоилфенилаланил-серина и этиловый эфир бензоилсерина не изменялись при 3-часовом воздействии ферментом или щелочью.

В проведенных опытах наблюдалась расщепляемость ферментами только сложноэфирной связи, образованной по гидроксилу серина и при условии открытого карбоксила у оксиаминокислоты.

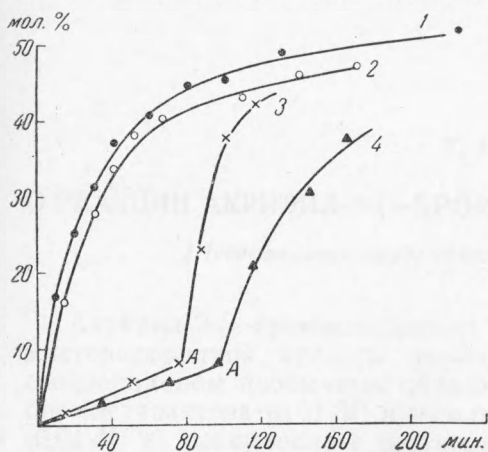


Рис. 1. Гидролиз эфирной связи N,O-(ди-ацетилфенилаланил)-серина. Растворитель 10 мл спирта + 8 мл воды + 2 мл 1/15 M фосфатного буфера. Температура 30–32°. В точке A прибавлено 0,01 г фермента

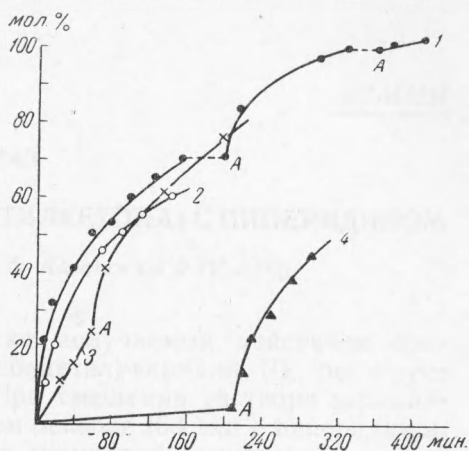


Рис. 2. Гидролиз эфирной связи N-бензоил-O-(бензоилфенилаланил)-серина. Растворитель 10 мл спирта + 8 мл воды + 2 мл 1/15 M фосфатного буфера. Температура 30–32°. В точке A прибавлено 0,01 г панкреатина

Кривые	Навеска в г	Фермент	pH
1	0,1262	0,01 г панкреатина . . .	8,2–8,3
2	0,1032	0,01 г трипсина . . .	8,2–8,3
3	0,1190	{ — 0,01 г панкреатина . . .	{ 9,0 8,3
4	0,1028	{ — 0,01 г трипсина . . .	{ 9,0–9,1 8,1–8,3

Кривые	Навеска в г	Фермент	pH
1	0,0983	0,01 г панкреатина . . .	8,2–8,3
2	0,0962	0,01 г трипсина . . .	8,2–8,3
3	0,0906	{ — 0,01 г панкреатина . . .	{ 10,0–10,3 8,2–8,3
4	0,1231	{ — 0,01 г панкреатина . . .	{ 8,1 8,1–8,3

Для дальнейшего изучения свойств O-пептидов серина нами исследуется их отношение к пепсину и папаину, а также проводятся опыты по ферментативному гидролизу эфирной связи в амидах N, O-пептидов серина.

Считаем своим приятным долгом выразить благодарность проф. С. Р. Мардашеву, К. И. Страичккому, М. Г. Крицман и Ю. С. Москвой за предоставление препаратов ферментов и чл.-корр. Академии медицинских наук СССР В. Н. Ореховичу за предоставление серина.

Поступило
19 III 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ E. Fischer, Ber., **39**, 530 (1906); A. Chibnall, Proc. Roy. Soc., [2], **131** B. 136 (1942); С. С. Перов, Биохимия белковых веществ, 1951. ² S. Kaufman и H. Neurath, Arch. Biochem., **21**, 437 (1949).