

И. Л. КАГАНОВА и В. Н. ОРЕХОВИЧ

О СОДЕРЖАНИИ ТРАНСПЕПТИДАЗ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 IX 1953)

Реакция транспептидации, заключающаяся в катализируемом ферментами переносе карбоксильной или аминной части одного пептида (донора) на аминный или карбоксильный конец аминокислоты или другого пептида (акцепторов), подробно описана в ряде работ, опубликованных в 1950—1953 гг. (1-3). Показано, что глутатион реагирует с различными аминокислотами в присутствии экстрактов некоторых органов с образованием новых пептидов, содержащих глутаминовую кислоту. γ -глутаминовая группировка из ее связи в глутатионе переносится на связь с аминогруппой аминокислоты-акцептора. Фермент, при помощи которого осуществляется эта реакция, назван γ -глутамилтранспептидазой. Этот фермент был обнаружен в почках овцы, свиньи, крысы, в лактирующей молочной железе крупного рогатого скота и в поджелудочной железе быка и крысы. Реакции транспептидации были проведены также и с другими пептидами в качестве доноров в присутствии кристаллических ферментов и очищенных ферментных препаратов (4-9).

Некоторыми исследователями было высказано предположение, что реакция транспептидации играет важную роль в процессе биосинтеза пептидов и, возможно, белков (10). В связи с этим нам казалось необходимым проследить распространение транспептидаз в различных органах и тканях. Для опытов нами были использованы органы морской свинки, крысы и крупного рогатого скота.

Во всех опытах в качестве донора использовался глутатион, акцептором служил фенилаланин и в некоторых случаях лейцин. Ферментный препарат готовился следующим образом. 3 г свежей ткани размельчались в 5 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,001 мол. $MgSO_4$. Гомогенат центрифугировался 15 мин. Центрифугат диализовался с перемешиванием 4 часа против 500 мл буфера. Диализованный ферментный препарат сохранялся в холодильнике без потери активности в течение 2—3 недель. Замороженные органы и ткани растирались в ступке с буфером, а затем обрабатывались так же, как и свежие органы. Для исследования активности фермента приготавливались смеси, содержащие $\frac{1}{3}$ объема раствора фермента, 0,05 мол. глутатиона, 0,05 мол. фенилаланина или лейцина; буфер фосфатный pH 7,4, содержащий 0,001 мол. $MgSO_4$. Общий объем смеси 0,3 мл; температура инкубации 35—37°. Реакция прекращалась осаждением белков 2 объемами теплого спирта. Смесь центрифугировалась, и центрифугат выпаривался досуха в эксикаторе. Осадок растворялся в воде (0,5—0,65 первоначального объема пробы) и анализировался хроматографически. В качестве растворителя для хроматограмм использовался 80% изопропиловый спирт. Время движения растворителя от 36 до 60 час. Об образовании пептида судили по появлению на хроматограмме нового пятна.

Нами исследовались следующие органы: почки и печень морской свинки; почки, печень, мозг и селезенка крысы; поджелудочная железа, надпочечники, гипофиз, щитовидная, зубная и молочная железы и яичники крупного рогатого скота. (Железы крупного рогатого скота мы получали в замороженном виде, органы морской свинки и крысы обрабатывались сразу после забоя этих животных.) Наиболее активные ферментные

препараты были получены нами из поджелудочной железы быка, почек морской свинки и крысы.

На рис. 1 представлена хроматограмма опыта, в котором в качестве ферментных препаратов были использованы почки и печень крысы, акцепторами служили фенилаланин и лейцин. В присутствии ферментного препарата из почек в течение первого часа образовывались новые пептиды, пятна 4 (если акцептором был фенилаланин, пробы №№ 4 и 8) и пятна 6 (если акцептором был лейцин, проба № 10). В начальных (контрольных) пробах №№ 3, 7, 9 новых пятен не обнаружено. В опытах с лейцином (в качестве акцептора) образование нового пептида протекает менее интенсивно, чем в опытах с фенилаланином. При увеличении времени инкубации до 18 час. количество вновь образованных пептидов значительно возрастало, что видно по увеличению интенсивности соответствующих пятен на хроматограмме. При наличии в системе одного глутатиона в отсутствие акцептора (проба № 2) новое

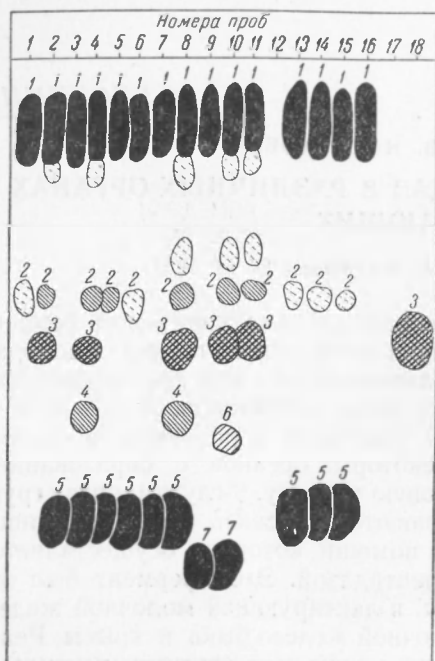


Рис. 1. Хроматограмма опыта с ферментным препаратом из почек и печени крысы. Время инкубации 1 час. Пятна: 1 — глутамин; 2 — глутаминовая кислота; 3 — глицин; 4 — глутамилфенилаланин; 5 — фенилаланин; 6 — глутамиллейцин; 7 — лейцин

пятно не появлялось. В присутствии прокипяченного ферментного препарата почек (пробы №№ 14 и 15) новый пептид не образовывался. Также не наблюдалось образования нового пептида в процессе инкубации свободной глутаминовой кислоты (вместо глутатиона) с фенилаланином. В пробах с ферментом из печени крыс (проба № 6) транспептидацию в первый час инкубации обнаружить не удалось.

Проводились опыты, в которых в смесь, где ферментом служил препарат из почек крысы, добавлялся фенолрот. Известно, что фенолрот тормозит активность глутаминазы — фермента, отщепляющего глутаминовую кислоту от глутатиона (11). В этих случаях транспептидация не происходила.

Пептид, вновь образовавшийся в процессе транспептидации между глутатионом и фенилаланином в присутствии фермента из почек крыс, элюировался с бумаги, гидролизровался 6 N раствором HCl в течение 24 час. В результате гидролиза освобождались глутаминовая кислота и фенилаланин. Установлено, что вновь образующийся пептид является γ -глутамилфенилаланином (2).

На рис. 2 изображена хроматограмма результатов опыта с печенью морской свинки. В первый час инкубации появление нового пептида обнаружить не удалось, и только после 3-часовой инкубации (проба № 3) появилось лишь слабое пятно пептида (4), которое становилось более

интенсивным после 6-часовой инкубации (проба № 4). В процессе дальнейшей инкубации проб количество вновь образованного пептида увеличивалось.

При добавлении к пробам ферментных экстрактов, приготовленных из печени, мозга и селезенки крысы в количествах, обычно применяемых в этих опытах, транспептидация не наблюдалась, даже при инкубации

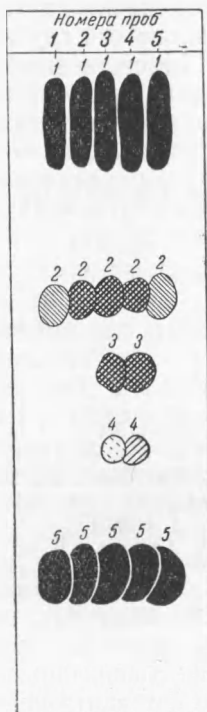


Рис. 2. Хроматограмма опыта с ферментным препаратом из печени морской свинки. Время инкубации разное. Обозначения пятен те же, что на рис. 1. Пробы №№ 1, 2 и 5 — инкубация 30 мин.; № 3 — инкубация 3 часа; № 4 — инкубация 6 час.

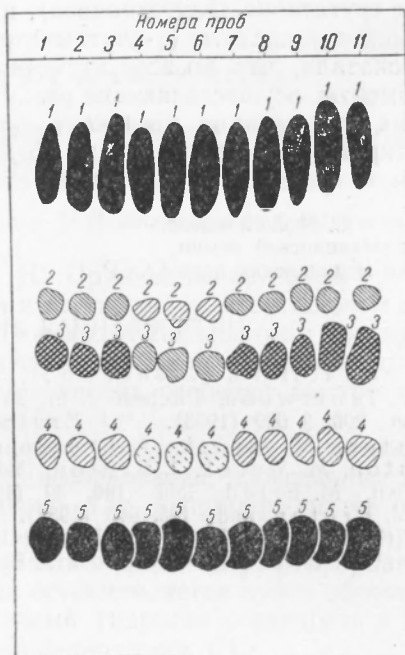


Рис. 3. Хроматограмма опытов с различными ферментными препаратами из желез внутренней секреции крупного рогатого скота и органов крысы. Обозначения пятен те же, что на рис. 1. Пробы: № 1 — с ферментным препаратом из гипофиза; № 2 — из щитовидной железы; № 3 — из надпочечников; № 4 — из зубной железы; № 5 — из молочной железы; № 6 — из яичников; № 7 — из селезенки; № 8 — из мозга; № 9 — из печени; №№ 10 и 11 — из почек

проб в течение 20 час. Однако при увеличении концентрации фермента в пробе в 5—10 раз наблюдался процесс транспептидации, и на хроматограмме появлялось пятно нового пептида.

Подобные же результаты получены с железами внутренней секреции крупного рогатого скота: щитовидной железой, гипофизом, надпочечниками, зубной и молочной железами, яичниками. При обычной концентрации ферментов количества вновь образовавшихся пептидов очень малы, и после инкубации в течение 20—24 час. пятна этого пептида на хроматограмме проявляются очень слабо. При увеличении концентрации фермента процесс транспептидации значительно усиливался. Хроматограмма опытов с печенью, мозгом, селезенкой крысы и железами внутренней секреции крупного рогатого скота с увеличенными концентрациями ферментов представлена на рис. 3.

В проведенных опытах реакция транспептидации имела место во всех случаях наряду с гидролизом глутатиона. В тканях, где гидролиз глутатиона незначителен, транспептидация шла хуже. В тех тканях, где глутатион гидролизовался быстро, образование новых пептидов было значительным. Обнаружить наличие реакции транспептидации в отсутствие гидролиза глутатиона нам не удалось.

Все эти данные, а также опыты, проведенные с фенолротом, показавшие отсутствие реакции транспептидации при торможении глутатионазы, подтверждают предположение, что фермент, отщепляющий глутаминовую кислоту от глутатиона (глутатионаза), и фермент, ответственный за перенос глутаминовой кислоты (γ -глутамилтранспептидаза), идентичны. Наши данные показали, что во всех изученных нами органах и тканях содержатся ферменты, осуществляющие реакцию транспептидации, хотя в разных тканях эта реакция протекает, повидимому, с различными скоростями. Широкое распространение реакции транспептидации говорит о возможном значении ее при биосинтезе пептидных связей.

Институт биологической
и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
9 VII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. Hanes, F. Hird, F. Isherwood, *Nature*, **166**, 4216 (1950). ² C. Hanes, F. Hird, F. Isherwood, *Biochem. J.* **51**, 25 (1952). ³ J. Kinoshita, E. Ball *J. Biol. Chem.*, **200**, 2 609 (1953). ⁴ J. Fruton, *Vale J. Biol. Med.*, **22**, 263 (1950). ⁵ R. Johnston, M. Mycek, J. Fruton, *J. Biol. Chem.*, **185**, 629, 2 (1950). ⁶ R. Johnston, M. Mycek, J. Fruton, *ibid.*, **187**, 205, 1 (1950). ⁷ J. Fruton, R. Johnston, M. Fried, *ibid.*, **190**, 39 (1951). ⁸ M. Jones, W. E. Hearn, M. Fried, J. Fruton, *ibid.*, **195**, 645 (1952). ⁹ L. Dowmont, J. Fruton, *ibid.*, **197**, 1, 271 (1952). ¹⁰ J. Fruton, Доклад на Парижском конгрессе биохимиков, июль, 1952. ¹¹ F. Binkley, C. Olson, *J. Biol. Chem.*, **188**, 451 (1951).