Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 5

БИОХИМИЯ

М. П. ЧЕРНИКОВ и В. О. ШПИКИТЕР

О РОЛИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ТРИПСИНА В ОБРАЗОВАНИИ КОМПЛЕКСА С ОВОМУКОИДОМ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 V 1955)

Было показано ([1-4]), что протеиназы образуют с белками ферментсубстратные комплексы, причем предполагается электростатическое взаимодействие между ферментом и субстратом. Однако прямых доказательств в пользу представлений получено не было. Потому мы полагаем, что дальнейшие исследования в этом направлении представляют существенный интерес.

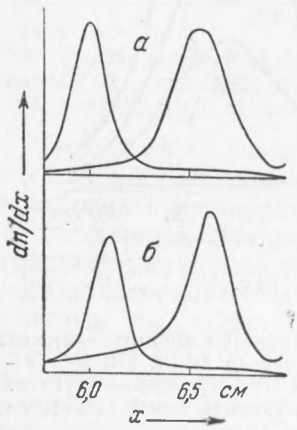

Рис. 1. Седиментационные диаграммы. *а* — смесь овомукоида и DIP-трипсина (1 : 1) через 60 и 210 мин. после достижения полной скорости; *б* — смесь трипсина и овомукоида (1 : 1) через 60 и 150 мин.

Известно, что диизопропилфторфосфат (DFP) тормозит действие эстераз ([5]) и таких протеиназ, как химотрипсины и трипсин ([6]), реагируя с ними в равномолекулярных отношениях. DFP взаимодействует с гидроксилом одного из 27 остатков серина в молекуле α-химотрипсина ([7]). Овомукоид, являющийся парализатором трипсина, образует с последним комплекс, константа седиментации которого (3,7—3,9 S) значительно выше констант седиментации трипсина (2,5 S) и овомукоида (2,4 S). Этот комплекс отличается от составляющих его компонентов и по электрофоретической подвижности ([2]). Учитывая это, мы попытались на этой модели выяснить вопрос об участии активного центра трипсина в образовании комплекса с белком.

Препарат овомукоида получался фракционированием яичного белка с помощью трихлорацетата натрия и спирта ([7]). Диизопропилфосфорилтрипсин (DIP-трипсин) получался действием большого избытка DFP на растворенный в фосфатном буфере (pH 7,9) препарат кристаллического трипсина (на 0,5 г трипсина 0,2 мл DFP), с последующим диализом при температуре +5° против водопроводной воды, а затем против сильно разбавленного раствора соляной кислоты (pH 2,5). Полученный препарат DIP-трипсина содержал 4% пептидов и обладал остаточной протеолитической активностью, составляющей 4% от исходной. В качестве активного трипсина использовался препарат кристаллического трипсина, полученный по методу Нортропа и Кунитца ([9]) и высушенный из замороженного состояния.

Исследования седиментации проводились с помощью масляной ультрацентрифуги Сведберга при скорости вращения 61 000 об/мин (ускорение 250 000 *g*) и температуре ротора 21°. Контроль за седиментацией осуществлялся методом совмещенных шкал и оптической системой с вертикальной цилиндрической линзой и наклонной щелью.

На рис. 1*а* представлены седиментационные диаграммы смеси овомукоида и DIP-трипсина, взятых в соотношениях 1 : 1 в 1/15 *М* фосфатном буфере pH 5,0 с общей концентрацией белка 1,0% через 60 и 210 мин. после достижения полной скорости. На рис. 1*б* приведены диаграммы седиментации смеси трипсина и овомукоида при тех же условиях через 60 и 150 мин. В обоих случаях на диаграммах имеется один пик, однако в первом случае он обусловливается близкими константами седиментации DIP-трипсина и овомукоида, во втором же имеет место образование комплекса трипсин — овомукоид, имеющего большую скорость седиментации. Из графика рис. 2 легко рассчитать константы седиментации для обоих случаев, используя формулу:

$$s = \frac{\Delta \ln x}{\Delta t \omega^2},$$

где x — расстояние границы от оси вращения, t — время и ω — угловая скорость. Для смеси DIP-трипсина и овомукоида мы получили $S = 2{,}57 \cdot 10^{-13}$, в то время как для комплекса трипсин — овомукоид $S = 3{,}7 \cdot 10^{-13}$. На рис. 3 представлены седиментационные диаграммы, полученные с помощью другой оптической системы. На рис. 3*а* даны картины седиментации смеси овомукоида с DIP-трипсином в соотношении 1 : 1 с общей концентрацией белка 1,5% в 1/15 *М* фосфатном буфере pH 5,0. Аналогичный опыт проделан с активным трипсином (рис. 3*б*). Наконец, последний опыт (рис. 3*в*) посвящен исследованию седиментации смеси овомукоида трипсина и DIP-трипсина в соотношениях 1 : 1 : 2, соответственно с общей концентрацией белка, равной 1,5% в том же буфере. Из этих опытов отчетливо видно, что активный трипсин образует комплекс, седиментирующий значительно быстрее, чем составляющие его компоненты, имеющие близкие константы седиментации. Неактивный DIP-трипсин не образует комплекса с овомукоидом. Это особенно хорошо видно на рис. 3*в*, где проявился как компонент, соответствующий комплексу, седиментирующий с большой скоростью, так и компонент, соответствующий DIP-трипсину с меньшей скоростью седиментации. Мы смогли подтвердить этот результат электрофоретическими опытами. Последние проводились в вероналовом буфере pH 7,15, ионной силой 0,2 при градиенте напряжения 3,5 в/см² и температуре +1°. Результаты трех электрофоретических опытов представлены на рис. 4. Как мы видим (рис. 4*а*), в этих

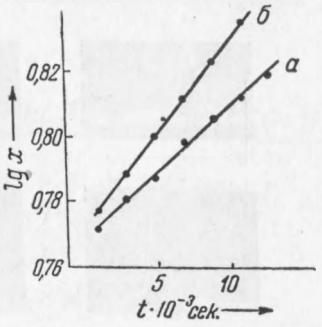

Рис. 2. Зависимость lg x от t: *а* — для смеси овомукоида и DIP-трипсина, *б* — для комплекса трипсин — овомукоид

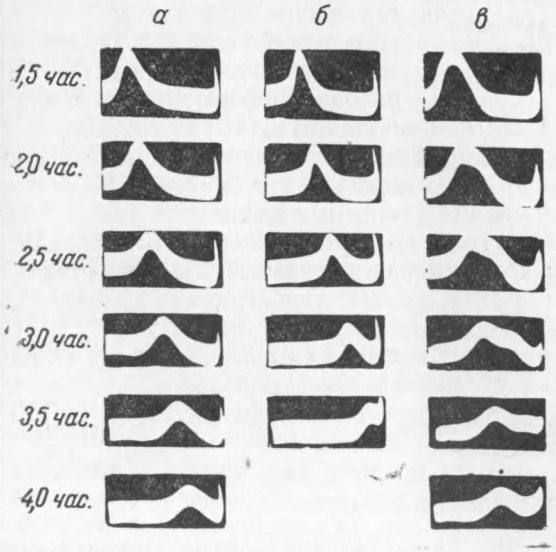

Рис. 3. Седиментационные картины. *а* — смесь овомукоида и DIP-трипсина (1 : 1), *б* — комплекс трипсин — овомукоид, *в* — смесь овомукоида, DIP-трипсина и трипсина (в соотношении 1 : 2 : 1)

условиях овомукоид движется к аноду, не обнаруживая свойственной ему гетерогенности при электрофоретическом исследовании ([10]), что связано с большой ионной силой примененного нами буфера. Образовавшийся комплекс активного трипсина с овомукоидом (рис. 4*б*) движется также к аноду, но значительно медленнее. В случае неактивного трипсина (рис. 4*в*) комплекса не образуется и компоненты движутся в электрическом поле независимо: овомукоид к аноду, DIP-трипсин к катоду.

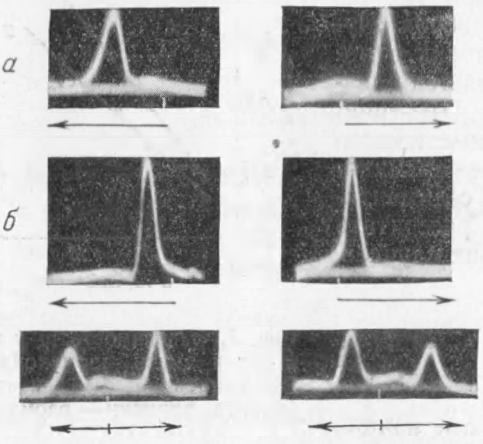

Рис. 4. Электрофоретические картины (через 180 мин.). *а* — овомукоида; *б* — смесь овомукоида с трипсином в соотношении 1 : 1; *в* — смесь овомукодиа с DIP-трипсином (1 : 1). Стрелки указывают направление движения. Слева — нисходящие границы. справа — восходящие

Показано, что блокировка свободных аминных групп трипсина ацетилированием приводит к сильному изменению электростатических свойств молекул фермента, что сказывается в изменении изоэлектрической точки от pH 10,5 для трипсина до pH 3,8 для ацетилтрипсина. В то же время ацетилированный трипсин сохраняет как ферментативную активность, так и способность к образованию комплекса с овомукоидом ([11]). Этот факт противоречит представлению, что электростатическое взаимодействие протеиназы и субстрата определяет образование ферментсубстратного комплекса. Угнетение трипсина DFP, приводящее почти к полному снятию протеолитической активности, связано, по всей вероятности, с неспособностью DIP-трипсина к образованию комплекса с белками. Известно, что угнетение трипсина DFP приводит также к снятию его способности к полимеризации ([12]). Эти факты говорят о решающей роли активного центра трипсина в образовании комплексов с белками. Вполне возможно, что активный центр протеиназы образует связь с субстратами за счет сил главных валентностей.

Выражаем глубокую благодарность действительному члену АМН СССР В. Н. Ореховичу за ценные указания и помощь в работе.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
11 III 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] D. S. Jasnoff, H. B. Bull, J. Biol. Chem., **200**, 619. (1953). [2] J. S. Ram, L. Terminiello, B. M. Bier, F. F. Nord, Arch. bioch. and biophys., **52**, 451 (1954). [3] H. J. Trurnit, Arch. bioch. and biophys., **47**, 251 (1953); **51**, 176 (1954). [4] М. П. Черников, Биохимия, **20**, 73 (1955). [5] N. K. Schaffer, S. C. May, W. H. Summerson, J. biol. Chem, **206**, 201 (1954). [6] E. F. Jansen, A. K. Balls, J. biol. Chem., **194**, 721 (1952). [7] N. K. Schaffer, S. C. May, W. H. Summerson, J. biol. Chem., **202**, 67 (1953). [8] E. Fredericq, H. F. Deutsch, J. biol. Chem., **181**, 499 (1949). [9] Д. Нортроп, М. Кунитц, Р. Херриот, Кристаллические ферменты, ИЛ, 1950. [10] M. Bier, L. Terminiello, et al., Arch. biochem. and biophys., **47**, 465 (1953). [11] J. S. Ram, L. Terminiello, M. Bier, F. F. Nord, Arch. bioch. and biophys., **52**, 464 (1954). [12] L. W. Cunningham, F. Tietze, N. M. Green, Disc. Faraday. Soc., **13**, 58 (1953).