



УДК 577.151.042+577.152.1.+577.175.32

ПЕПТИДИЛГЛИЦИН α -АМИДИРУЮЩАЯ
МОНООКСИГЕНАЗА ИЗ ГРАНУЛ АДЕНОГИПОФИЗА:
ОЧИСТКА И СВОЙСТВА

ШАРОЯН С. Г., АБРАМЯН К. С., НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из секреторных гранул передней доли гипофиза быка получен в электрофоретически гомогенном виде фермент, амидирующий синтетический трипептид dl-Ala-Gly-Gly . Величина M_r фермента по данным гель-фильтрации через сефадекс G-100 и электрофореза в 10%-ном ПААГ с ДДС-Na равна 60 ± 3 кД. Выход белка составляет примерно 1 мг на 100 г сырой ткани аденогипофиза. Оптимум pH находится в области 7,0—7,4. Показано, что фермент является медьсодержащей монооксигеназой. Установлено, что низкие концентрации ионов двухвалентной меди стимулируют активность фермента, а высокие приводят к его ингибированию.

Bradbury и соавт. [1] впервые обнаружили в нейросекреторных гранулах гипофиза свиньи фермент с $M_r \approx 60$ кД, способный превращать пептид-предшественник гормона ($-X-Gly$) в пептид-амид ($-X-NH_2$), являющийся активной формой пептидного гормона. В качестве субстрата в этих исследованиях был использован синтетический трипептид $D-Tyr-Val-Gly$, имеющий структурное сходство с карбоксильным концом предполагаемого предшественника α -меланоцитстимулирующего гормона. Для изучения специфичности действия этого фермента были использованы синтетические трипептиды [2, 3] с измененной аминокислотой в положениях 2 и 3. В результате этих исследований было установлено, что фермент строго специфичен по отношению к C-концевой аминокислоте, которая должна представлять собой глицин. В работах другой группы авторов исследовались свойства частично очищенного амидирующего фермента из разных отделов гипофиза крысы и быка [4—6]. Было обнаружено, что активность фермента полностью подавляется хелаторами двухвалентных металлов. Авторы далее показали, что из 10 различных ионов двухвалентных металлов только Ca^{2+} полностью восстанавливает активность фермента. Таким образом, был сделан вывод, что амидирующий фермент является медьзависимым. Как оказалось, для работы фермента необходим молекулярный кислород, следовательно, амидирующий фермент представляет собой оксидоредуктазу. Из нескольких исследо-

ванных кофакторов наивысшая активность проявлялась — в присутствии аскорбиновой кислоты. Исходя из этих данных, было предложено называть этот фермент пептидилглицин α -амидирующей монооксигеназой (ПАМ).

В последние годы аналогичная ферментативная активность была обнаружена во многих эндокринных тканях, а также жидкостях животных и человека (гипофиз, гипоталамус, щитовидная железа, плазма крови, СМЖ, нижнечелюстные железы, предсердие, околоушные железы) [7—10]. В большинстве из этих работ амидирующую активность измеряли либо в грубых гомогенатах ткани, либо в частично очищенном препарате фермента. Во всех случаях было показано, что активность стимулируется Cu^{2+} , аскорбатом и требует наличия кислорода.

В настоящее время известны лишь два исследования, в которых фермент удалось получить в гомогенном состоянии. В одном из них Mizuno и соавт. [11] выделили очищенный фермент с M_r 39 кД из секрета кожи лягушки, в другом Murthy и соавт. [12] удалось получить из средней доли гипофиза быка две формы фермента: ПАМ-А и ПАМ-В. Как выяснилось, ПАМ-В при электрофорезе в 10%-ном ПААГ дает одну полосу, соответствующую M_r 37 кД, тогда как основная полоса ПАМ-А соответствует 48 кД, однако препарат содержал также минорные примеси. ПАМ-А обнаруживает кислые свойства, адсорбируясь на ДЭАЭ-ц и элюируется с нее 0,1 М NaCl, тогда как ПАМ-В не адсорбируется на ней. В связи с изложенным представлялось интересным выделить и изучить свойства амидирующего фермента из гранул, полученных из других долей гипофиза, и в частности из передней доли (аденогипофиза).

Материалы и методы

Получение секреторных гранул аденогипофиза и их лизис. Гранулы получали как из свежей, так и из замороженной при -70° ткани аденогипофиза крупного рогатого скота. Все процедуры осуществляли при 4° . Передние доли гипофиза очищали от пленки и соседних тканей и промывали раствором 0,3 М сахарозы, содержащим 0,01 М Na^+ , K^+ -фосфатный буфер, pH 6,2. Отмытую от крови ткань (100—200 г) гомогенизировали в том же буферном растворе из расчета ткань/буфер, равном 1/5 (вес/объем) в течение 30 с в гомогенизаторе РТ-1 при скорости 8000 об/мин. Гомогенизацию продолжали в гомогенизаторе Поттера-Эльvehейма со свободно пригнанным тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугировали при 1000 g 8 мин. Осадок еще дважды обрабатывали аналогичным образом в гомогенизаторе Поттера-Эльvehейма и центрифугировали 5 мин при 1000 g для удаления ядер и неразрушенных клеток. Объединенные надосадочные растворы фильтровали через двойной слой марли и центрифугировали 50 мин при 6000 g. Осадок суспендировали в исходном буферном растворе из расчета 1 мл на 1 г исходной ткани и наслаивали на градиент сахарозы со слоями 1,6 и 1,3 М. Центрифугирование проводили на горизонтальном роторе VAC-602 1 ч при 80000 g. Субклеточные частицы, оказавшиеся в 1,6 М слое и в осадке, представ-

ляют собой секреторные гранулы. Как показал электронномикроскопический анализ, гранулы, полученные описанным способом из свежей ткани, полностью сохраняют нативную структуру и практически свободны от примесей других субклеточных органелл (рис. 1, а). Они, однако, гетерогенны по размерам и плотности. В случае замороженной ткани гранулы также нативны, однако в полученной фракции содержатся примеси митохондрий и других частиц, составляющие не более 10%. Гранулы хранили в 30—40%-ной сахарозе при -30° . При таком способе хранения большинство гранул (90%) сохраняется в нативном виде даже при длительности хранения несколько месяцев. Выход влажной пасты гранул составляет примерно 10% от веса сырой очищенной ткани аденогипофиза.

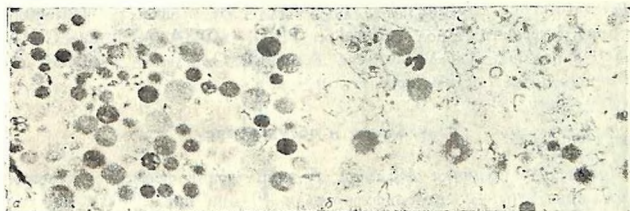


Рис. 1. Электронномикроскопические снимки гранул аденогипофиза быка (увеличение 32000 X): а—нативные гранулы, б—лиозированные гранулы.

Лизис гранул осуществляли многократным замораживанием в жидком азоте и последующим размораживанием суспензии гранул в 0,1 М глицин—NaOH буфере, pH 9,0. Как видно из рис. 1, б, эта процедура приводит к разрушению более 80% гранул.

Определение активности ПАМ. Разработали методику определения активности ПАМ, используя о-фталальдегид (о-ФДА) в качестве флуоресцентной метки. Как известно, о-ФДА в присутствии 2-меркаптоэтанола образует с первичными аминами флуорофоры. Метод позволяет определять аминокислоты, пептиды и белки в пикомолярном диапазоне [13]. В качестве субстрата использовали синтетический трипептид dl-Ala-Gly-Gly («Reanal», Венгрия). Для определения активности фермент инкубировали с субстратом в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 26° 3 ч. Объем инкубационной среды составлял 0,52 мл. Конечные концентрации компонентов в инкубационной смеси составляли: субстрата—200 мкг/мл, фермента—10 мкг/мл, ионов меди—0—10 мкмоль. К 50 мкл аликвотам добавляли 200 мкл 0,015%-ного раствора о-ФДА в 0,1 М боратном буфере, pH 9,7, содержащем 10^{-3} М 2-меркаптоэтанола. Пробы инкубировали 9 мин при комнатной температуре, затем добавляли 3 мл воды и сразу регистрировали флуоресценцию смеси в относительных единицах при $\lambda_{\text{возб.}} = 344$ нм, $\lambda_{\text{эм.}} = 450$ нм. Скорость ферментативной реакции определяли как количество мкмоль образовавшегося флуоресцирующего продукта на мкг белка в течение 1 ч.

Аналитические методы и реактивы. Флуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре MPF-44 A («Perkin—Elmer», США) в односантиметровой кювете при комнатной температуре. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре модели 26 («Beckman», Австрия) также в односантиметровых кюветах. Содержание белка определяли по поглощению при 278 нм и по методу Lowry и соавт. [14]. Величину M_r белков оценивали гель-фильтрацией через сефадекс G-100 и электрофорезом в 10%-ном ПААГ по методу Weber, Osborn [15]. Медь определяли химическим путем, используя тетраэтилтиурам дисульфид в качестве хелирующего реагента [16]. Величину коэффициента экстинкции окрашенного комплекса меди с реагентом при 420 нм принимали равной $37400 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Были использованы сефадексы G-100 и SP-сефадекс C-50 («Pharmacia», Швеция), реактивы для электрофореза («Reanal», Венгрия), 2-меркаптоэтанол («Ferak», ФРГ), о-ФДА («Sigma», США), ДЭАЭ-52 целлюлоза («Whatman», Англия). Остальные реактивы отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а.

Результаты и обсуждение

Получение и очистка фермента. Для получения фермента суспензию лизированных гранул центрифугировали 40 мин при 26000 g, полученный осадок гранул вновь суспендировали в 0,1 М глицин-NaOH буфере, pH 9,0, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльvehейма с жестко пригнанным пестиком и центрифугировали при тех же условиях. Для полной белковой экстракции описанную обработку гранул проводили 7—8 раз. Надосадочные растворы объединяли и доводили pH до 6,5 добавлением 0,2 М уксусной кислоты. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием, а экстракт после диализа против 0,01 М фосфатного буфера, pH 6,6, концентрировали на колонке с ДЭАЭ-ц, уравновешенной тем же буфером. Колонку промывали исходным буфером и белковые фракции элюировали 0,1 М фосфатным буфером, содержащим 0,4 М NaCl. Полученный элюат подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-100, уравновешенный 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,6, содержащим 0,1 М NaCl. На рис. 2 представлена типичная элюионная диаграмма, получаемая на этой стадии очистки. Амидирующей активностью обладает только фракция 2 (отмечена черточками). Определение меди в пробах выявило наличие его во фракциях 1,2 и 4. Для дальнейшей очистки фермента фракцию 2 концентрировали на колонке с ДЭАЭ-ц, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,6. Колонку промывали 100 мл порциями 0,01 М, 0,02 М и 0,03 М буфера и собирали фракцию, элюирующуюся 0,1 М буфером, содержащим 0,4 М NaCl. Элюат вновь пропускали через сефадекс G-100 (сверхтонкий). Основной белковый пик, полученный на этой стадии, соответствует M_r 60 кД и обладает амидирующей активностью. Для последующей очистки фермента pH раствора снижали до 4,0 добавлением 0,2 М уксусной кислоты и наносили на небольшую колонку с SP-сефадексом, C-50, уравнове-

шенную 0,01 М ацетатным буфером, рН 4,1. При этих условиях хроматографии ПАМ не адсорбируется на колонке. Элюирующуюся без задержки фракцию концентрировали на небольшой колонке с ДЭАЭ-ц. Полученный таким образом белок является гомогенным при электрофорезе в 7%-ном ПААГ. Инкубирование препарата в смеси 1% ДДС-Na—5 М мочевины—1%-ный 2-меркаптоэтанол приводит к появлению одной полосы при электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na, которая соответствует $M_r 60 \pm 3$ кД (рис. 3). Данные гель-фильтрации также приводят к величине $M_r 60$ кД. По описанной процедуре удастся получить около 1 мг электрофоретически гомогенного фермента из 100 г сырой ткани аденогипофиза (или 10 г пасты гранул). Использованный метод очистки позволяет получить препарат ПАМ, имеющий величину У. А. порядка 10 мкмоль/мкг белка/ч, что в 50000 раз выше, чем у исходного гомогената.

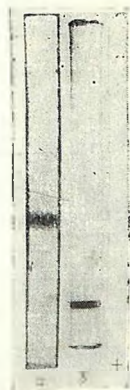
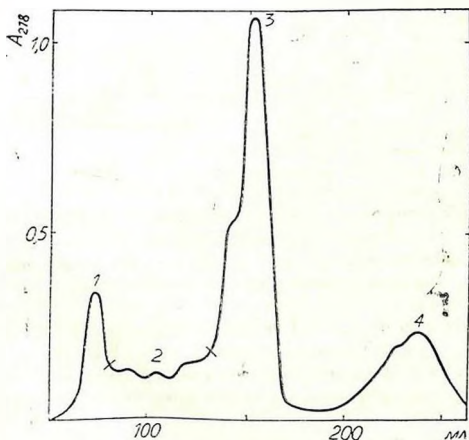


Рис. 2. Элюиционная диаграмма, полученная при гель-фильтрации экстракта гранул через сефадекс G-100. Размер колонки 3×37 см

Рис. 3. Электрофоретические картины очищенного фермента (анод внизу): а — нативный препарат в 7%-ном ПААГ, б — электрофорез выполнен в 10%-ном ПААГ, содержащем 0,1% ДДС-Na после предобработки фермента в диссоциирующих условиях. Количество нанесенного белка равно 40 мкг

Свойства ПАМ. Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что фермент состоит из одной полипептидной цепи. Определение меди в препарате белка показало, что ПАМ из аденогипофиза является медь-содержащим ферментом: на молекулу массой 60 кД приходится один атом меди.

Нами было исследовано влияние рН, ионной силы и ионов меди на активность ПАМ. На рис. 4 приведены данные о влиянии рН и ионной

силы на активность фермента: рН-оптимум оказался в диапазоне 7,0—7,4; активность фермента резко падает при рН 6,0. Из рисунка видно, что активность ПАМ также зависит от ионной силы среды. Полученная зависимость имеет колоколообразный вид с максимумом при 0,1 М. В присутствии 0,5 М NaCl активность фермента падает примерно в 20 раз по сравнению с 0,1 М буфером.

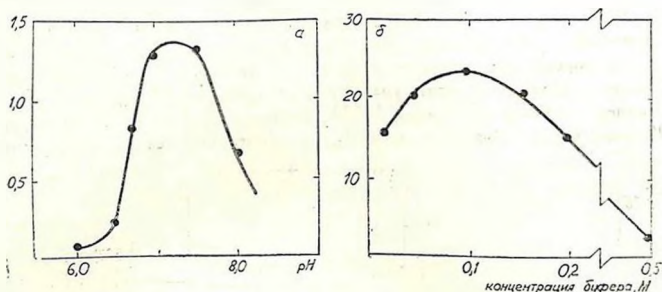


Рис. 4. Зависимость активности фермента: а—от рН, б—от ионной силы среды. Активность выражена в усл. ед.

При исследовании влияния ионов меди обнаружилось, что при концентрации Cu^{2+} , равной 1—3 мкмоль, фермент активируется в 2—3 раза, однако более высокие концентрации Cu^{2+} приводили к его ингибированию. Так, 10 мкмоль Cu^{2+} уменьшают скорость ферментативной реакции в 6—7 раз.

Хранение фермента при 4° в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,4 М NaCl, практически не сказывалось на его активности в течение трех недель. Однако даже однократное замораживание препарата в этом же буфере с последующим размораживанием приводит к полной потере активности ПАМ.

Как было отмечено выше, в экстракте секреторных гранул аденогипофиза содержатся, по крайней мере, три медьсодержащие фракции. Одним из медьсодержащих компонентов сравнительно низкомолекулярной фракции 4 (рис. 2) оказался нейрокупренин—кислый медьсодержащий белок с M_r около 9 кД, обнаруженный нами ранее в больших полушариях головного мозга крупного рогатого скота [17]. Очистка и более подробное изучение других медьсодержащих компонентов фракций 1 и 4, возможное регуляторное воздействие их на активность амидирующего фермента является предметом нашего дальнейшего исследования.

В последние годы в литературе обсуждается вопрос о роли амидирующего фермента в передней доле гипофиза, ибо, в отличие от средней и задней долей, где большинство известных гормонов амидированы с карбоксильного конца, идентифицированные гормоны передней доли не амидированы с С-конца [18]. В этой связи представляют интерес данные

Murthy и соавт. [12] о соотношении ПАМ активности в трех долях гипофиза быка. Согласно их данным, активность фермента в передней доле в 8 раз меньше, чем в средней и задней долях. Противоположные данные получены в работе Eipper и соавт. [4], где наибольшая амидирующая активность отмечалась именно в аденогипофизе крысы. Таким образом, полученные в настоящей работе данные являются прямым экспериментальным подтверждением недавнего предположения [18] о том, что в аденогипофизе существуют еще не идентифицированные амидированные на С-конце биологически активные пептиды, для синтеза которых и требуется амидирующий фермент. Очистка и изучение свойств этих амидированных пептидов может приоткрыть новые регуляторные механизмы, находящиеся под контролем аденогипофиза.

PEPTIDYLGLYCINE α -AMIDATING MONOOXYGENASE FROM GRANULES OF THE ANTERIOR PITUITARY: PURIFICATION AND PROPERTIES

SHAROYAN S. G., ABRAMYAN K. S., NALBANDYAN R. M.
Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

The enzyme which amidates synthetic peptide dl-Ala-Gly-Gly was purified as electrophoretically homogeneous preparation from secretory granules of the anterior lobe of bovine pituitary. The yield of the enzyme was 1 mg per 100 g of wet weight of the anterior lobe. According to the gel-filtration and polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate M_r of the enzyme was found to be of 60 ± 3 kD. Effects of pH, ionic strength and freezing-thawing on the activity of the enzyme were studied. The enzyme is considered to be the copper-containing monooxygenase. Cu^{2+} at low concentrations stimulates the enzyme activity, whereas at high ones it leads to inhibition.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradbury A., Finnie M., Smyth D. *Nature*, v. 298, p. 686—688, 1982.
2. Bradbury A., Smyth D. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 112, p. 372—377, 1983.
3. Landymore-Lim A., Bradbury A., Smyth D. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 117, p. 289—293, 1983.
4. Eipper B., Mains R., Glembotski Ch. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 80, p. 5144—5148, 1983.
5. Mains R., Glembotski Ch., Eipper B. *Endocrinology*, v. 114, p. 1522—1530, 1984.
6. Glembotski Ch., Eipper B., Mains R. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 6385—6392, 1984.
7. Eipper B., Myers A., Mains R. *Endocrinology*, v. 116, p. 2497—2504, 1985.
8. Baylin S., Eipper B., Mains R. *Metab. Clin. Exp.*, v. 34, p. 1044—1052, 1985.
9. Wang G., Ney R., Mains R., Eipper B. *Neuroendocrinology*, v. 41, p. 482—489, 1985.

10. *Sakata Y., Mizuno K., Matsuo H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 140, p. 230—236, 1986.
11. *Mizuno K., Sakata Y., Kojima M., Kangawa K., Matsuo H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 137, p. 984—991, 1986.
12. *Murthy A., Mains R., Eipper B. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 1815—1822, 1986.
13. *Benson Y., Hare P.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, p. 619—622, 1975.
14. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J.* Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. *Weber K., Osborn M. J.* Biol. Chem., v. 244, p. 4406—4412, 1969.
16. *Matsuba Y., Takahashi Y.* Anal. Biochem., v. 36, p. 182—191, 1970.
17. *Sharoyan S., Shaljian H., Nalbandyan R., Buniatian H.* Biochim. et biophys. acta, v. 493, p. 473—487, 1977.
18. *Glembotski Ch.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 241, p. 673—683, 1985.

Поступила 14. III 1988