

УДК

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИНКЗАВИСИМОЙ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ *Bacillus intermedius*

© 2010 г. Н.Л. Рудакова^{1*}, Н.П. Балабан¹, Ю.В. Данилова¹,
Г.Н. Руденская², М.Р. Шарипова¹

¹ Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,
420008 Казань, ул. Кремлевская, 18; факс: (843)238-7121,
электронная почта: bio.dep@ksu.ru

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: (495)932-8846,
электронная почта: lunin@direction.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 28.04.10
После доработки 21.06.10

Выделена новая цинкзависимая металлоэндопептидаза *Bacillus intermedius* (MrgVi) из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis*. Установлена аминокислотная последовательность гомогенного белка методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Определена N-концевая аминокислотная последовательность зрелого белка – ASTGSQKVTV. Определены физико-химические свойства фермента, его субстратная специфичность. Молекулярная масса металлопротеиназы равна 19 кДа, $K_m = 0,06$ мМ, $k_{cat} = 1210$ с⁻¹, изоэлектрическая точка – 5,4. Изучено влияние на активность фермента различных ингибиторов и ионов металлов. На основе анализа аминокислотной последовательности расширенного мотива активного центра и Met-поворота, а также свойств белка сделано заключение, что бактериальная металлопротеиназа MrgVi относится к астациноподобным эндопептидазам клана метцинкинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: металлопротеиназа, астациноподобная протеиназа, метцинкины, *Bacillus subtilis*, *Bacillus intermedius*.

Большинство металлоэндопептидаз являются цинкзависимыми (цинкины) и содержат в активном центре высококонсервативную последовательность HEXXH с двумя остатками гистидина в качестве цинковых лигандов. В зависимости от положения третьего цинкового лиганда цинкины классифицируют как глутинкины (HEXXH + E), аспцинкины (HEXXH + D) и метцинкины (HEXXHXXGXXH/D + Met-поворот) [1]. Характерным признаком метцинкинов является расширенный мотив активного центра и присутствие консервативного остатка метионина в 1,4-β-петле, называемой Met-поворотом. В свою очередь, метцинкины делят на семейства астацинов, сerratилинов, матриксинов и адамализинов/репролизинов [1]. Несмотря на большое различие последовательностей, эти ферменты имеют схожую третичную структуру каталитического домена [2]. В их активном центре имеются три гистидиновых остатка (цинковые

лиганды), а также остатки глутамата и глицина, которые играют важную роль в осуществлении каталитического акта. Тирозиновый остаток Met-поворота у астацинов и сerratилинов выполняет роль «тирозинового переключателя», являясь пятым цинковым лигандом и ответственным за субстратное связывание и/или стабилизацию переходного состояния во время катализа [3]. У представителей семейств матриксинов и адамализинов/репролизинов в Met-повороте тирозиновый остаток заменен на пролин и активация этих ферментов происходит по механизму «цистеинового переключателя» [4].

Эукариотические метцинкины, как правило, являющиеся мультидоменными белками, содержат кроме каталитического домена на C-конце молекулы и другие домены. Исключение составляет астацин (20,3 кДа), впервые выделенный из пищеварительного тракта речного рака *Astacus astacus* L, зрелая форма которого представляет протеазный домен из 200 аминокислотных остатков (а.о.) с N-концевым аланином [5]. Астацин синтезируется как неактивный предшественник с сигнальным пептидом и пропептидом на N-конце каталитического домена. Описана единственная бактериальная астаци-

Принятые сокращения: PMSF – phenylmethylsulphonyl fluoride, pCMB – p-chlormercuribenzoate, Dnp – dinitrophenyl, MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight.

* Адресат для корреспонденции.

ноподобная эндопептидаза флавастацин *Flavobacterium meningosepticum*, в последовательности которой содержится высококонсервативный цинк-связанный мотив активного центра HELMNAI-GFYH и Met-поворот SVMMY с остатком тирозина [6]. Бактериальные серрализины также синтезируются как зимогены с пропептидом на N-конце, однако, секреторный сигнал находится в C-концевой области [1].

Эукариотические метцинкины играют важную роль в эмбриональном развитии и дифференцировке тканей, вовлечены в иммунные реакции, в развитие патологических состояний (ревматоидных артритов, воспалительных процессов, атеросклероза, онкологических заболеваний), способствуют миграции клеток, играют важную роль в органогенезе, дегенерации тканей, а также при делении, проникновении и метастазировании раковых клеток [1, 2].

Функциональная значимость этих ферментов диктует необходимость их исследования, в том числе в качестве потенциальных лекарственных средств. На этом пути особый интерес представляют бактериальные белки, аналоги эукариотических метцинкинов, являющиеся не только идеальной моделью для фундаментальных исследований, но и обладающие высоким потенциалом практического применения. Поиск, выделение и изучение бактериальных метцинкинов стали возможны с развитием постгеномных технологий, поскольку микроорганизмы синтезируют следовые количества этих ферментов и их выделение связано с проблемой клонирования и повышения эффективности экспрессии. Целью работы является разработка эффективного метода получения гомогенного препарата секретируемой цинкзависимой металлопротеиназы *B. intermedius* из рекомбинантного штамма *B. subtilis* и изучение свойств гомогенного белка.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали мультикопийную плазмиду pSA1, производную плазмиды pCM4, которая несет вставку геномной ДНК *B. intermedius* размером 1000 пар нуклеотидов (1 т.п.о.) с геном секретируемой металлопротеиназы (*mprBi*), GenBank accession number EU678894. Штаммом-реципиентом являлся штамм *B. subtilis* BG 2036, в геноме которого делетированы гены внеклеточных протеаз (*Dapr*, *Δnpr*), любезно предоставленный проф. E. Ferrari (Genencor Int. Inc., USA).

Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили по методу Anagnostopoulos и Spizizen [7]. Культивирование рекомбинант-

ного штамма проводили на среде, описанной ранее, на вибростенде («В. Braun», Германия) в течение 30 ч при 200 об/мин [8]. Отношение объема среды к объему колбы составляло 1 : 5. Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 10 000 г.

Протеолитическую активность металлопротеиназы определяли по расщеплению азоказеина [9, 10]. Измерение проводили на спектрофотометре («Bio-Rad», США) при длине волны 450 нм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующее в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин.

Белок определяли спектрофотометрически, принимая поглощение раствора белка с концентрацией 1 мг/мл в кювете толщиной 1 см при 280 нм равным одной оптической единице. Также проводили определение концентрации белка по методу Бредфорд [11].

Выделение металлопротеиназы *B. intermedius* проводили из 1 л культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* с помощью дробного фракционирования сульфатом аммония в интервале насыщения 0,2–0,7. Сульфатаммонийную фракцию диализовали против 0,05 М буфера Tris-HCl, pH, 7,3, до исчезновения следов сульфата аммония. Очистку фермента проводили на колонке с бутил-сефарозой «HiTrap» («Pharmacia»). Для осуществления связывания металлопротеиназы с бутил-сефарозой в раствор фермента необходимо внести сульфат аммония до концентрации, близкой к той, при которой фермент теряет активность и выпадает в осадок (35%). Колонку с бутил-сефарозой уравновешивали с буфером 0,05 М Tris-HCl, pH 7,3, содержащим 5 мМ Ca²⁺ и 35%-ный сульфат аммония. Фермент перед нанесением на колонку диализовали против этого буфера. Элюцию фермента с колонки проводили тем же буфером с понижением концентрации сульфата аммония до 20–15%. Полученные фракции собирали и диализовали против 0,05 М буфера Tris-HCl, pH 7,3, с 5 мМ Ca²⁺.

Степень чистоты полученных препаратов определяли электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ в присутствии Ds-Na по методу Лэммли [12]. Окраску проводили двумя красителями: Coomassie brilliant blue G-250 («Serva») и раствором ZnCl₂. При использовании второго способа окрашивания, чувствительность которого около 30 нг белка [13], гель предварительно выдерживали в течение 10 мин в 0,2 М растворе имидазола, а затем переносили в 0,3 М раствор ZnCl₂. Для приготовления обоих растворов использовали деионизированную воду. Молекулярную массу фермента определяли электрофоретичес-

ки, используя маркерные белки фирмы «Sigma» (США), (кДа): БСА (66), овальбумин (45), папаин (20,6), лизоцим (14,4).

Для выяснения влияния ингибиторов на активность металлопротеиназы препарат фермента выдерживали в присутствии реагента в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего определяли остаточную активность по гидролизу азоказеина. Остаточную активность выражали в процентах относительно активности в отсутствие ингибиторов в реакционной смеси. В работе использовали: специфический ингибитор сериновых протеиназ PMSF, ингибиторы металлопротеиназ ЭДТА и 1,10-фенантролин, а также рСМВ, HgCl₂ и белковый ингибитор трипсина. Ингибиторы добавляли к раствору фермента до конечных концентраций 0,5 мМ и 5 мМ.

Гомогенный препарат белка анализировали с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF. Металлопротеиназу обрабатывали трипсином по методу, предлагаемому фирмой «Sigma-Aldrich» (www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/maldi_tof_ms_analysis.Par.0001.File.tmp/maldi_tof_ms_analysis.pdf). Полученные пептиды идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF (ThermoBioanalysis, Великобритания). Данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint (www.matrixscience.com) и Peptide Mass (www.expasy.net/tools/peptide-mass.html).

N-концевую аминокислотную последовательность белка определяли методом Эдмана на приборе Model 816 Protein Sequences («Гиссен», Германия) с использованием анализатора 120A PTH (Applied Biosystems, США). Положение сигнального пептида определяли путем анализа нуклеотидной последовательности гена *mprBi* при помощи программы SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP).

Константу Михаэлиса K_m определяли по гидролизу азоказеина путем построения графика в координатах Лайнуивера–Бэрка. Изoeлектрическую точку фермента определяли на основе аминокислотной последовательности с использованием программы «ProtParam» (www.expasy.net/cgi-bin/protparam).

Субстратную специфичность металлопротеиназы определяли по гидролизу синтетических субстратов Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH₂, Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg, Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg, Dnp-Gly-Gly-Lys, Dnp-Gly-Gly-Leu-Arg, Dnp-Ala-Ala-Val-Arg по методу Люблинской и др. [14]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в данных условиях гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Анализ пептидов, полученных при гидролизе В-цепи окисленного инсулина, проводили с помощью метода масс-

спектрометрии MALDI-TOF (<http://expasy.net/tools>). Активность металлопротеиназы в гидролизе казеина по Гаммерстену («Sigma», США) и яичного альбумина («Sigma», США) определяли по методу Каверзневой, используя 2%-ный раствор соответствующего субстрата в 0,1 М буфере Tris-HCl, pH 9,0 [15]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкМ тирозина за 1 мин на 1 мл ферментного раствора.

При изучении влияния ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы использовали хлориды кальция, магния, кобальта, меди и никеля в конечной концентрации от 1 до 20 мМ, хлорид цинка – в конечной концентрации от 0,01 до 20 мМ. К ферментному раствору добавляли растворы двухвалентных металлов и выдерживали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем определяли активность фермента по гидролизу азоказеина и выражали в процентах относительно активности фермента в отсутствие ионов металлов.

pH-Оптимальную активность фермента определяли по гидролизу азоказеина в 0,05 М буфере Tris-HCl, pH 7,3, с 5 мМ Ca²⁺ в интервале pH от 7,2 до 9,5. Для определения pH-стабильности проводили инкубацию растворов белка с pH от 7,2 до 9,5 в том же буфере в течение 24 ч при комнатной температуре, далее добавляли раствор субстрата и определяли активность как описано выше.

Температурный оптимальный фермента в 0,05 М HCl-буфере, pH 8,0, с 5 мМ Ca²⁺ определяли по гидролизу азоказеина как описано выше, при температуре от 22 до 70°. Для изучения термостабильности растворы ферментов в 0,05 М Tris-HCl-буфере, pH 8,0, с 5 мМ Ca²⁺ предварительно инкубировали при температурах от 22 до 70° в течение 40 мин, затем добавляли раствор субстрата и определяли активность при 37° как описано выше.

Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было изучено накопление протеолитической активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*, несущего плазмиду с геном металлопротеиназы *B. intermedius*. Максимальная активность обнаружена нами после 30-часового роста культуры, тогда как в культуральной жидкости бесплазмидного

Таблица 1. Выделение и очистка металлопротеиназы MprVi из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. Subtilis*

Стадия очистки	V, мл	Белок, мг	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Культуральная жидкость	760	11 400	0,05	100
Диализ сульфатаммонийной фракции	24	312	1,03	54
Хроматография на бутил-сефарозе	70	3,8	17,4	11,3

штамма активность определялась в следовых количествах на протяжении всего времени культивирования.

Выделение фермента из культуральной жидкости 30-часовой культуры рекомбинантного штамма проводили с использованием дробного осаждения сульфатом аммония в интервале насыщения 0,2–0,7. В диализате сульфат аммонийной фракции удельная активность фермента повысилась в 20 раз по сравнению с культуральной жидкостью, выход целевого белка составил 54% (табл. 1). Для получения гомогенного фермента использовали хроматографию на колонке с гидрофобным носителем бутил-сефарозой. Фермент элюировали с колонки при концентрации сульфата аммония 20–15% (рис. 1). В результате хроматографии удельная активность фермента повысилась почти в 350 раз, выход составил 11,3% (табл. 1). С помощью электрофореза белка в присутствии Ds-Na было установлено, что после хроматографии на колонке с бутил-сефарозой нами получен гомогенный белок (рис. 2, дорожка 3), тогда как диализат сульфат аммонийной фракции содержал несколько белковых полос (рис. 2, дорожка 2). Молекулярная масса металлопротеиназы, определенная электрофоретически, составила 19 кДа.

Таким образом, для получения гомогенного препарата протеиназы MprVi мы использовали две стадии очистки, тогда как при выделении внеклеточных металлопротеиназ часто используют от 3 до 5 стадий, включая осаждение белка сульфатом аммония, ультрафильтрацию, классическую ионообменную и аффинную хроматографию. Большое количество стадий очистки ведет к потере выхода конечного продукта. Разработанная нами методика позволила уменьшить затраты времени на очистку фермента и получить гомогенный белок с выходом более 10%.

Изучение влияния различных ингибиторов на активность металлопротеиназы показало, что фермент не ингибируется PMSF и белковым ингибитором трипсина, но практически полностью его активность подавляется 1,10-фенаantroлином, а также высокими концентрациями

ЭДТА, что подтверждает принадлежность фермента к классу металлопротеиназ (табл. 2). Высокие концентрации рСМВ почти полностью ингибируют активность фермента, что позволило предположить наличие остатка цистеина в молекуле белка.

С помощью метода MALDI-TOF-спектрометрии нами была установлена аминокислотная последовательность полученного гомогенного белка MprVi (рис. 3). N-концевая последовательность белка, полученная методом Эдмана, содержит 10 аминокислот ASTGSQKVTV с N-концевым аланином. Установлено, что аминокислотная последовательность металлопротеиназы идентична последовательности аминокислот, полученной на основании последовательности нуклеотидов секвенированного нами гена *mprVi* (GenBank accession number EU678894). Анализ последовательности гена позволил установить, что сигнальный пептид расположен на N-конце белка. В аминокислотной последовательности MprVi мы идентифицировали фрагмент с консервативными аминокислотными остатками

Таблица 2. Влияние ингибиторов ферментов на активность металлопротеиназы *B. intermedius*

Ингибитор	Остаточная активность, %	
	0,5 мМ ингибитор	5 мМ ингибитор
PMSF	94	91
ЭДТА	96	5,7
1,10-Фенаantroлин	5,8	0
рСМВ	94	1,9
HgCl ₂	51	40
Белковый ингибитор трипсина	97	100

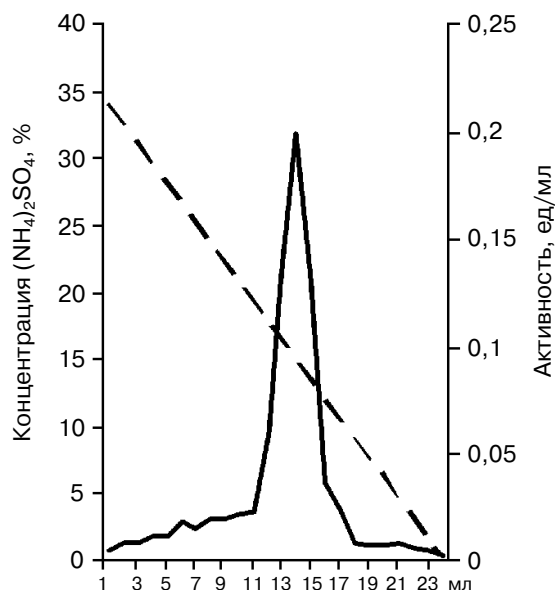


Рис. 1. Хроматография на бутил-сефарозе. Сплошная линия — активность белка по гидролизу азоказеина; штриховая линия — концентрация сульфата аммония

(выделены полужирным шрифтом) **HEVGHNF-GLPH**, структура которого позволила отнести эндопептидазу MprVi к классу цинкзависимых металлопротеиназ (рис. 4). В этом фрагменте содержатся три гистидиновых остатка His126, His130 и His136, остаток глутамата Glu127, расположенный рядом с первым гистидином, и остаток глицина Gly133 между вторым и третьим гистидиновыми остатками. Все они характерны для расширенного мотива активного центра семи семейств клана метцинкинов [16].

В аминокислотной последовательности эндопептидазы MprVi обнаружен единственный остаток метионина (Met147) вблизи остатка тирозина (Tyr149). Наличие этих остатков в зрелой молекуле MprVi позволяет сделать предположение о том, что фрагмент CLMNY представляет собой структуру Met-поворота, локализованного на расстоянии 8 а.о. от С-конца расширенного мотива активного центра. В связи с этим, полученная нами цинкзависимая металлоэндопептидаза MprVi может быть отнесена к клану метцинкинов. Известно также, что тирозиновый остаток в структуре Met-поворота характерен только для семейств астацинов и серрализинов [17–19]. В семействах матриксинов и адамализинов/репролизинов этот остаток почти всегда заменен на нефункциональный пролин, не принимающий участия в каталитическом акте. Следует отметить, что бактериальные серрали-

зины секретируются как зимогены с N-концевым пропептидом, но секреторный сигнал локализован на С-конце [1]. Тот факт, что протеиназа MprVi синтезируется с сигнальным пептидом на N-конце молекулы фермента, а также наличие консервативного остатка Tyr149 в Met-повороте дает нам основание предполагать, что эндопептидаза MprVi относится к семейству астациноподобных пептидаз. Однако следует отметить, что в протяженном мотиве активного центра MprVi рядом с третьим цинковым лигандом His136 в структуре белка находится остаток аспартата Asp137, тогда как у астациноподобных пептидаз в этом участке идентифицирован остаток глутамата (рис. 4). В астациноподобных эндопептидазах остаток глутамата (Glu103) (нумерация по астацину) ориентирован с помощью молекулы воды таким образом, что образует с N-концевым Ala1 солевой мостик, стабилизирующий молекулу фермента. По мнению некоторых исследователей образование солевого мостика между Glu103 и Ala1 является настолько важным для стабилизации белковой глобулы, что глутамат Glu103 часто относят к каталитическим аминокислотным остаткам, входящим в активный центр фермента [20–22]. Остаток аспартата Asp137 в этом участке активного центра

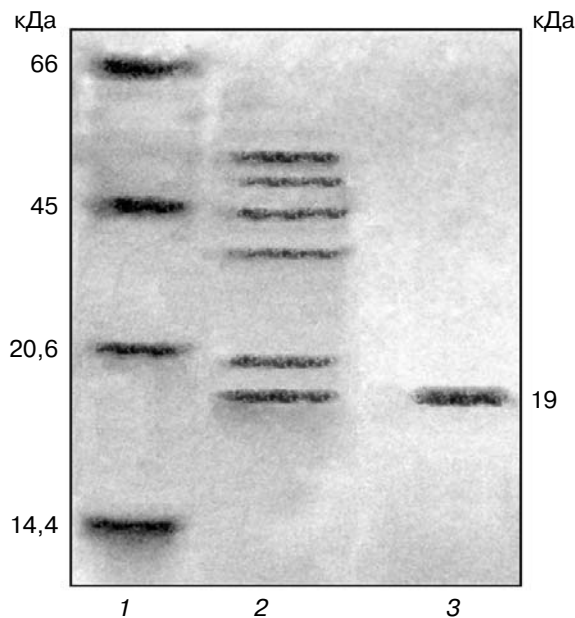


Рис. 2. Ds-Na-ПААГ-электрофорез. 1 — Маркеры: БСА (66 кДа), овальбумин (45 кДа), папаин (20,6 кДа), лизоцим (14,4 кДа); 2 — фракция белка после осаждения сульфатом аммония; 3 — фракция белка после очистки на бутил-сефарозе

1 **ASTGSQKVTV** YAVADAQYRA KYSDWQTRIV SIEQADVTF
 41 NRDHDVDFVV QAVGSWTSSG SNAEQILSNL SRSFDGRGYD
 81 FVTGFTANPN FDAGGIAYVY NSAPSGSAFA VNLDQGTANT
 121 АКААТ**HEYGH** **NFGLPHD**PQG SGIV**CLMNY**D YSYTVDFFDA
 161 АНKNQVNRNK AWYR

Рис. 3. Аминокислотная последовательность зрелого белка MprBi. Полужирным шрифтом отмечены первые 10 аминокислот на N-конце зрелого белка (ASTGSQKVTV). Рамками выделены мотив активного центра и Met-поворот

Метцинкиновые металлопротеиназы	мотив активного центра	% сходства с MprBi	Met-поворот
АСТАЦИНЫ			
Астацин (рак)	H E L M H A I G F Y H E	42	S I M H Y
α-МЕР (мышь)	H E I L H A L G F F H E	42	S L M H Y
β-МЕР (крыса)	H E F L H A L G F W H E	42	S V M H Y
ВМР1/проколлагеновая С-протеиназа (человек)	H E L G H V V G F W H E	50	S T M H Y
SPAN/ВР10 (морской ёж)	H E I G H A I G F H H E	50	S I M H Y
Толлоид (<i>Dr. melanogaster</i>)	H E L G H T I G F H H E	50	S I M H Y
РЕПРОЛИЗИНЫ			
Адамализин II (<i>C. adamanteus</i>)	H E L G H N L G M E H D	66	C I M R P
Атролизин С	H E L G H N L G M E H D	66	C I M R P
Тримерелизин	H E L G H N L G M E H D	66	C I M S D
	126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137		145 146 147 148 149
MprBi (<i>B. intermedius</i>)	H E Y G H N F G L P H D		C L M N Y

Рис. 4. Мотив активного центра и Met-поворот различных представителей семейства астацинов и репролизинов [22]

характерен для всех известных представителей семейства репролизинов, т.е. мотив активного центра MprBi по 12 каталитически важным аминокислотным остаткам полностью совпадает с мотивом активного центра репролизинов. Таким образом, учитывая этот факт, а также наличие консервативного остатка Tyr149 в Met-повороте эндопептидазы MprBi, который отсутствует в Met-повороте репролизинов, мы предполагаем,

что бациллярная металлоэндопептидаза MprBi занимает промежуточное положение между ферментами семейств астацинов и репролизинов.

Константа Михаэлиса K_m для фермента составила 0,06 мМ, каталитическая константа k_{cat} равна 1210 с⁻¹. Изоэлектрическая точка металлопротеиназы составляет 5,4. рН-Оптимальности металлопротеиназы в 0,05 М буфере

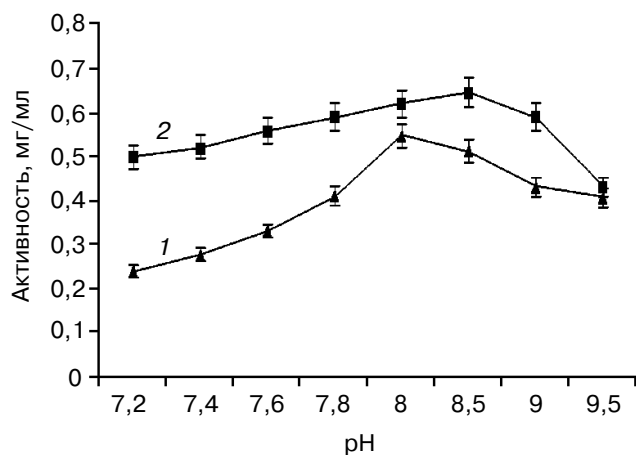


Рис. 5. pH-зависимости активности (1) и стабильности (2) металлопротеиназы

Tris-HCl с 5 мМ Ca^{2+} соответствует 8,0, что указывает на то, что исследуемый фермент относится к группе щелочных металлопротеаз (рис. 5, а). Белок стабилен в интервале pH от 7,2 до 9,0 (рис. 5, б). Температурный оптимум фермента соответствует 50–55° (рис. 6, а). Белок проявляет стабильность в интервале температур от 22 до 55° (рис. 6, б).

Была исследована специфичность металлопротеиназы MprVi по гидролизу синтетических хромогенных субстратов (табл. 3). Металлопротеиназа MprVi гидролизует синтетические тетрапептиды интенсивнее, чем трипептиды; вероятно, более длинные субстраты быстрее связываются с активным центром фермента [23, 24]. Амид синтетического тетрапептида практически также хорошо гидролизруется ферментом, как и тетрапептиды с карбоксильной группой, и лишь гидролиз тетрапептида Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg идет с низкой скоростью. Металлопротеиназа не проявляет строгой субстратной специфичности, так как спектр аминокислотных остатков, образующих гидролизующую пептидную связь, достаточно широк.

Определена также специфичность металлопротеиназы в гидролизе В-цепи окисленного инсулина. Данные масс-спектрометрии при изучении продуктов расщепления подтвердили, что фермент не проявляет предпочтения к определенным аминокислотам расщепляемой пептидной связи (рис. 7), что свидетельствует о широкой субстратной специфичности протеиназы MprVi. В то же время эндопептидаза PrtA из патогенного насекомого *Photographus luminescens*, относящаяся к семейству серрализинов, гидролизует В-цепь окисленного инсулина только по

Таблица 3. Специфичность металлопротеиназы в гидролизе синтетических субстратов

Субстрат	Активность $\times 10^3$, ед/мг
Dnp-Gly-Gly-Leu-Arg	5,15
Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg	3,65
Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH ₂	2,82
Dnp-Ala-Ala-Val-Arg	2,64
Dnp-Gly-Gly-Lys	1,45
Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg	0,57

связям Val, Ala и Leu [25]. При гидролизе белковых субстратов эндопептидазой MprVi показано, что фермент предпочтительнее расщепляет казеин (удельная активность 32,9 ед/мг), чем альбумин (удельная активность 5,5 ед/мг).

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность фермента показало, что ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} в концентрации 10 мМ повышают активность белка на 30 и 20% соответственно. Ионы Co^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} в концентрациях от 1 до 20 мМ снижают активность металлопротеиназы, причем, с увеличением концентрации это снижение более значительно. Низкие концентрации ионов Zn^{2+} (0,01 мМ) практически не влияют на активность фермента, увеличение же его концентрации приводит к резкому снижению активности (рис. 8). Так, для термостабильности установлено, что внесение в раствор фер-

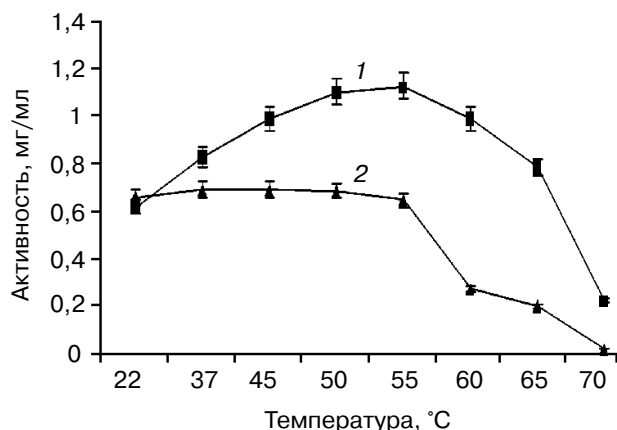


Рис. 6. Влияние температуры на активность (1) и стабильность (2) металлопротеиназы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gomis-Ruth, F.X. (2003) *Mol. Biotechnology*, **24**, 157–202.
- Sterchi, E.E., Stocker, W., and Bond, J.S. (2008) *Molecular Aspects of Medicine*, **29**, 309–328.
- Yiallourous, I., Berkhoff, E.G., and Stocker, W. (2000) *FEBS Lett.*, **484**, 224–228.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L., and Bode, W. (1993) *FEBS*, **335**, 76–80.
- Titani, K., Torff, H.-J., Hormel, S., Kumar, S., Walsh, K.A., Rodi, L., Neurath, H., and Zwilling, R. (1987) *Biochemistry*, **26**, 385–392.
- Tarentino, A.L., Quinones, G., Grimwood, B.G., Hauer, C.R., Plummer, and T.H. Jr. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 1, 281–285.
- Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961) *J. Bacteriol.*, **81**, 741–746.
- Balaban, N.P., Gabdrakhmanova, L.A., Sharipova, M.R., Sokolova, E.A., Malikova, L.A., Mardanova, A.M., Rudenskaya, G.N., and Leschinskaya, I.B. (2004) *J. Basic Microbiol.*, **44**, 415–423.
- Charnay, J., and Tomarelli, R.M. (1947) *J. Biochem.*, **177**, 501–505.
- Demidyuk, I.V., Romanova, D.V., Nosovskaya, E.A., Chestukhina, G.G., Kuranova, I.P., and Kostrov, S.V. (2004) *Prot. Eng., Des. and Selec.*, **17**, 411–416.
- Bradford, M.M. (1976) *Analyt. Biochem.*, **8**, 248–254.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680–685.
- Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250. Режим доступа: http://www.molbiol.ru/protocol/17_02.html, свободный. – Проверено 1.12.2009.
- Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н. (1987) *Биоорг. химия*, **13**, 748–753.
- Каверзнева Д.Е. (1971) *Прикл. биохимия и микробиология*, **7**, 225–228.
- Gomis-Ruth, F.X. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 15353–15357.
- Gomis-Ruth, F.X., Stocker, W., Huber, R., Zwilling, R., and Bode, W. (1993) *J. Biol. Chem.*, **229**, 945–968.
- Baumann, U. (1994) *J. Mol. Biol.*, **242**, 244–251.
- Delepelaire, P., and Wandersma, C. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 17118–17125.
- Jiang, W., and Bond, J.S. (1992) *FEBS Lett.*, **312**, 110–114.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.-X., Huber, R., Zwilling, R., and Stocker, W. (1992) *Nature*, **358**, 164–167.
- Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Schilling, O., Wegmann, F., Helms, M.W., Auge, A., Brachtendorf, G., Berkhoff, E.G., Beermann, B., Hinz, H.-J., Konig, S., Peter-Katalinic, J., and Stocker, W. (2002) *J. Mol. Biol.*, **324**, 237–246.
- Воюшина Т.Л., Терентьева Е.Ю., Поздеев В.Ф., Гайда А.В., Гололобов М.Ю. Люблинская Л.А., Степанов В.М. (1991) *Биоорг.химия*, **17**, 1066–1073.
- Stocker, W., Ng, M., and Auld, D.S. (1990) *Biochemistry*, **29**, 10418–10425.
- Marokhazi, J., Mihala, N., Hudecz, F., Fodor, A., Graf, L., and Venekei, I. (2007) *FEBS J.*, **274**, 1946–1956.
- Roche, R.S., and Voordouw, G. (1978) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **5**, 1–23.
- Matsui, T., Fujimura, Y., and Titani, K. (2000) *BBA*, **1477**, 146–156.

CHARACTERISTIC OF ZINC-DEPENDENT *Bacillus intermedius* ENDOPEPTIDASE

N. L. Rudakova^{1*}, N. P. Balaban¹, Y. V. Danilova¹,
G. N. Rudenskaya², M. R. Sharipova¹

¹ Kazan State University, ul. Kremlevskaya. 18, Kazan 420008, Russia; fax: (843)238-71-21, E-mail: bio.dep@ksu.ru

² Chemistry Faculty, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia; fax: (495)932-88-46, E-mail: lunin@direction.chem.msu.ru

Received April 28, 2010

Revision received June 21, 2010

Novel alkaline metalloproteinase *Bacillus intermedius* (MprBi) was purified from culture media of recombinant strain *Bacillus subtilis* BG 2036 (pCM4) by chromatography on a hydrophobic butyl-Sepharose column. MALDI-TOF mass spectroscopy revealed the amino acid sequence of the enzyme. The sequence of the first ten residues from the N-terminus of the mature protein was determined to be ASTGSQKVTV. The molecular weight of the proteinase was 19 kD, $K_m = 0.06$ mM, $k_{cat} = 1213$ sec⁻¹, pI 5.4. Also investigated were the physicochemical characteristics of the enzyme, the substrate specificity, and the sensitivities to different inhibitors and metal ions. Based on structural analysis and enzyme characteristics, we suggest that the novel bacterial metalloproteinase is an astacin-like metalloproteinase of metzincins.

Key words: metalloproteinase, astacin-like proteinase, metzincins, *Bacillus subtilis*, *Bacillus intermedius*