



УДК 577.158.4

ПОЛИГЛОБУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА КСАНТИНОКСИДАЗЫ МОЛОКА,
НАЙДЕННАЯ МЕТОДОМ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА.
ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТА,
ЛИШЕННОГО ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕотиДА
И СОХРАНЯЮЩЕГО КСАНТИНДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ
АКТИВНОСТЬ *

Наглер Л. Г., Андреев В. М., Вартамян Л. С.

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва

Протеолиз трипсином, химотрипсином или субтилизином при pH 8 не влияет существенно на молекулярный вес и активность ксантиноксидазы из молока коровы, но при этом каждая из двух цепей А (M 150 000), входящих в состав молекулы фермента, расщепляется в этих условиях на три фрагмента С, Е и F с M 92 000, 40 000 и 15 000—20 000 соответственно. Эти фрагменты прочно связаны друг с другом нековалентными связями и относительно резистентны к последующему протеолизу. Кинетический анализ протеолиза показывает, что фрагменты С, Е, F в интактных цепях А расположены в порядке С—Е—F. Представлена модель ксантиноксидазы, в которой фрагменты С, Е и F образуют отдельные глобулы, связанные между собой небольшими петлями полипептидной цепи, легко доступными действию протеаз. Действие субтилизина на ксантиноксидазу при pH 11 приводит к полному протеолизу цепей Е и отделению FAD; при этом полностью утрачивается ксантин: O_2 -оксидоредуктазная, но мало меняется ксантин:индофенол-оксидоредуктазная активность фермента. Активный фрагмент имеет $M \sim 200$ 000, состоит в основном из двух цепей С, содержит Mo и не содержит FAD.

Ксантиноксидаза из коровьего молока (ксантин: O_2 -оксидоредуктаза КФ 1.2.3.2) имеет $M \sim 300$ 000 [1]. Нативный фермент состоит из двух очень длинных полипептидных цепей А с M 150 000 [2]. Мы предположили, что каждая цепь может быть свернута в несколько глобул, соединенных короткими участками той же цепи, причем эти участки легко доступны для действия протеаз [2]. Кофакторами ксантиноксидазы являются две молекулы FAD, 2 атома Mo, 8 атомов Fe и 8 атомов кислотолabileй серы [3]. Фермент имеет низкую специфичность как по отношению к донорам электронов (различные пурины, пиримидины, птеридины, альдегиды), так и по отношению к акцепторам. Кроме молекулярного кислорода акцепторами электронов могут служить, например, тетразолиевые соли, метиленовый синий, ФМС, различные производные индофенола [4].

В настоящей работе для изучения глобулярной структуры ксантиноксидазы в качестве основного метода использован ограниченный протеолиз; метод дает возможность отличить компактные глобулярные участки белка, которые резистентны к протеолизу, от развернутых, которые в определенных условиях полностью расщепляются протеолитическими ферментами.

* Сокращения: FAD — флавинадениндинуклеотид; ФМС — феназинметосульфат; ДСН — додецилсульфат натрия.

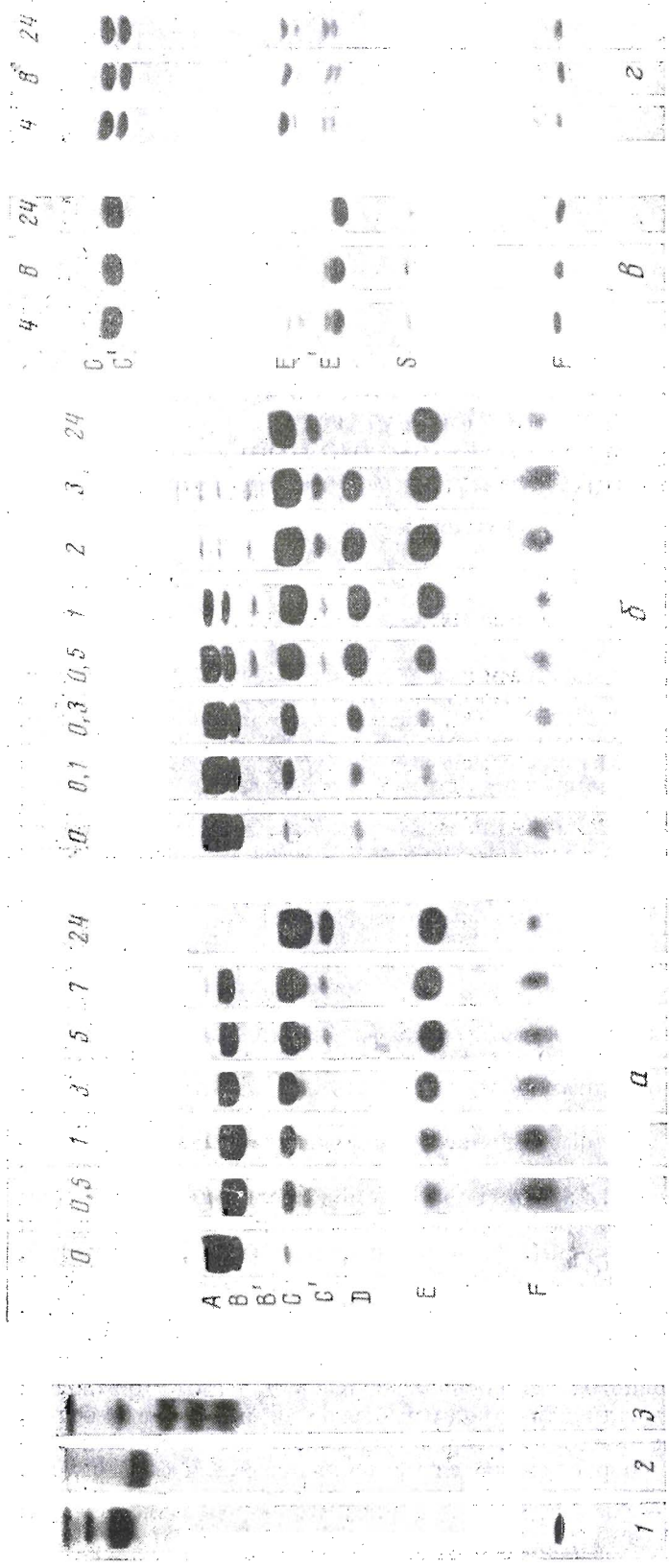


Рис. 1

Рис. 1. Электрофорез ксантиноксидазы в 7,5%-ном полиакриламидном геле (без ДСН). Ксантиноксидаза: 1 — нативная; 2 — после протеолиза трипсином при pH 8 в течение 24 ч при весовом соотношении ксантиноксидазы к трипсину 100 : 1 (форма КО-1); 3 — после протеолиза субтиламином при pH 11 (форма КО-2)

Рис. 2

Рис. 2. Анализ продуктов протеолиза ксантиноксидазы электрофорезом в полиакриламидном геле: а, б — электрофорез в присутствии ДСН в 5%-ном полиакриламидном геле [5], а, б — в 10%-ном полиакриламидном геле [6], протеолиз: а — трипсином, весовое отношение ксантиноксидаза/трипсин 50 : 1; б — хмотрепсином, весовое отношение ксантиноксидаза/хмотрепсин 100 : 1; в, г — субтиламином и трипсином в весовом соотношении ксантиноксидаза/протеаза 10 : 1 соответственно, S — субтиламин, А — F — полипептидные цепи. Над гелями указано время инкубации с протеолитическими ферментами в часах.

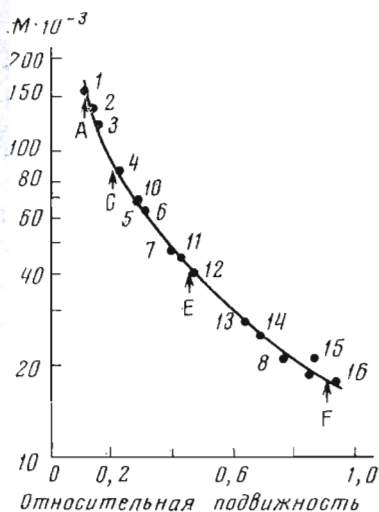


Рис. 3

Рис. 3. Определение молекулярных весов полипептидных цепей А, С, Е, F, полученных в результате ограниченного протеолиза ксантиноксидазы при рН 8. Белки, использованные для построения калибровочного графика (в скобках даны молекулярные веса): белки бактериофага Т4 [42, 43]: 1 — P34 (150 000), 2 — P7 (140 000), 3 — P37 (120 000), 4 — P10 (88 000), 5 — P18 (69 000), 6 — P20 (63 000), 7 — P23* (46 500), 8 — IPIII* (21 000), 9 — P19 (18 000), 10 — бычий сывороточный альбумин (68 000), 11 — яичный альбумин (43 000), 12 — альдолаза из мышц кролика (40 000), 13 — субтилизин А (27 600), 14 — бычий химотрипсиноген (25 700), 15 — ингибитор трипсина из сои (20 100), 16 — миоглобин лошади (17 200)

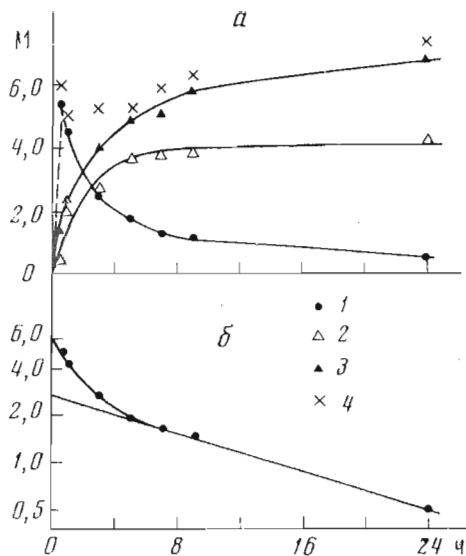


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика протеолиза ксантиноксидазы трипсином: а — изменение относительных молярных концентраций (М) полипептидных цепей В (1), С (2), Е (3) и F (4) в зависимости от времени протеолиза; б — полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой для компонента В

Было показано, что при электрофорезе в полиакриламидном геле нативная ксантиноксидаза движется одной, довольно широкой полосой (рис. 1). Кроме основной в препарате обычно обнаруживаются 2—3 дополнительные полосы с меньшей подвижностью. Как основная, так и дополнительные полосы обладали ксантиндегидрогеназной активностью.

Для определения числа полипептидных цепей фермент диссоциировали на полипептидные цепи прогреванием в присутствии ДСН и меркаптоэтанола. Продукты диссоциации анализировали при помощи электрофореза в присутствии ДСН в 5%-ном [5] или в 10%-ном полиакриламидном геле [6]. Как видно из рис. 2, а (нулевое время протеолиза), фермент содержит в основном цепи А с M 150 000 (80%). Кроме того, имеется примесь цепей В с M 135 000 (~15%) и очень малые количества цепей С и D соответственно с M 92 000 и 60 000. Для определения молекулярных весов полипептидных цепей строили калибровочные графики со стандартными белками. На рис. 3 представлен калибровочный график при проведении электрофореза по методу Леммли [6]. Известно, что молоко содержит сывороточную протеазу, которая по ферментативным свойствам очень сходна с трипсином [7]. При выделении ксантиноксидазы в присутствии диизопропилфторфосфата электрофоретическая картина полипептидных цепей фермента существенно не менялась. Вероятно, ограниченный протеолиз ксантиноксидазы начинается еще в молоке, в результате чего часть цепей А превращается в цепи В, С и D. Необходимо отметить, что ксантиноксидаза была получена нами без применения панкреатина, который используют обычно при выделении фермента для переваривания белков молока.

Ранее нами было показано, что ксантинооксидаза, выделенная с применением папкреатина, подвергается ограниченному протеолизу [8].

При исследовании кинетики протеолиза ксантинооксидазы трипсином, химотрипсином и субтилизином продукты протеолиза анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН. Полученные данные, часть которых была опубликована ранее [2], показали, что при действии трипсина (рис. 2, а) наблюдается очень быстрое исчезновение цепей А (M 150 000); вместо них образуются цепи В (M 135 000) и F (M 15 000—20 000). Цепи В и F образуются приблизительно в эквимольных количествах с исходными цепями А (рис. 4, а). Очевидно, сначала происходит расщепление цепи А на цепи В и F, а затем расщепление цепей В, сопровождающееся накоплением цепей С (M 92 000) и Е (M 40 000). Кроме того, в геле обнаруживаются дополнительная полоса С' (M 84 000) и плохо разделяемые полосы между Е и F. На рис. 4, а показано изменение относительных молярных концентраций цепей В, С, Е и F в зависимости от времени инкубации с трипсином.

Цепи В расщепляются почти полностью через 24 ч. Кинетика их расщепления двухкомпонентна (рис. 4, б) и может быть описана в виде суммы двух экспонент:

$$[B] = [B_1]_0 \exp(-k_1 t) + [B_2]_0 \exp(-k_2 t),$$

где $k_1 = 9,2 \cdot 10^{-3}$ мин $^{-1}$; $k_2 = 8,3 \cdot 10^{-4}$ мин $^{-1}$; $[B_1]_0 / ([B_1]_0 + [B_2]_0) = 0,6$; $[B_2]_0 / ([B_1]_0 + [B_2]_0) = 0,4$.

Накопление цепей С происходит по экспоненциальному закону, причем константа скорости их образования равна константе скорости распада B_1 — быстро исчезающего компонента цепей В. После полного распада компонента B_1 (через 5—7 ч) образуется эквимольное количество цепей С, которое далее не меняется до 24 ч протеолиза. Эти факты дают основание предположить, что использованный препарат ксантинооксидазы неоднороден (или стал неоднороден на той стадии протеолиза, когда образовались цепи В) и состоит из двух молекулярных форм, одна из которых содержит полипептидные цепи типа B_1 (60%), а другая — типа B_2 (40%). При дальнейшем протеолизе трипсином из цепей типа B_1 (но не из типа B_2) образуются цепи С, сравнительно резистентные к дальнейшему протеолизу трипсином.

Одновременно с распадом цепей В и накоплением цепей С образуются цепи Е. Кинетика накопления цепей Е в общем следует кинетике распада суммарных цепей В. Вероятно, цепи Е образуются как из цепей B_1 , так и из цепей B_2 . Поскольку сумма молекулярных весов цепей С и Е в пределах точности измерений равняется молекулярному весу цепей В, то эти данные позволяют предложить следующую схему протеолиза ксантинооксидазы трипсином:

цепи А (M 150 000) очень быстро цепи В (M 135 000) + цепи F (M 15 000—20 000),
 цепи В = $[B_1]_0$ (60%) + $[B_2]_0$ (40%), компонент B_1 быстро цепи С (M 92 000) + цепи Е (M 40 000), компонент B_2 медленно цепи Е (M 40 000) + ? (но не цепи С).

Какие фрагменты, кроме цепи Е, образуются при распаде цепей типа B_2 , неизвестно. Из участка B_2 , соответствующего С, могут, например, образоваться фрагменты, по молекулярному весу близкие к цепям Е или F, или же эти участки полностью расщепляются трипсином до кислоторастворимых пептидов.

При протеолизе химотрипсином происходит постепенное расщепление цепей А и В, содержащихся в исходном препарате ксантинооксидазы (рис. 2, б). Одновременно происходит накопление тех же относительно стабильных продуктов протеолиза, что и в случае протеолиза трипсином, — цепей С, Е и F. Кроме того, при протеолизе химотрипсином появляется в значительных количествах фрагмент D (M 62 000), содержание

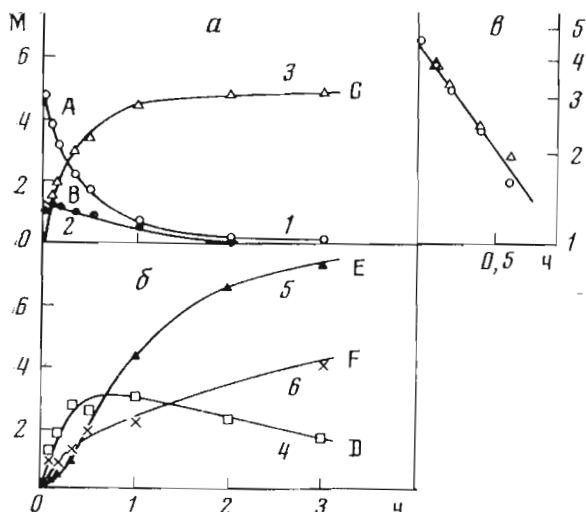


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика протеолиза ксантиноксидазы химотрипсином: *a, б* — изменение относительных молярных концентраций (*M*) полипептидных цепей: А — (1), В — (2), С — (3), D — (4), Е — (5), F — (6) в зависимости от времени протеолиза; *a* — полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой для компонентов А и С. На оси ординат отложена концентрация С в логарифмическом масштабе

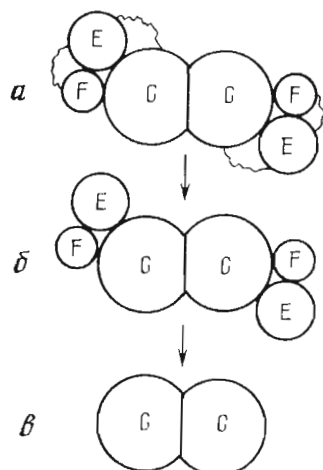


Рис. 6

Рис. 6. Структурные модели различных форм ксантиноксидазы: *a* — нативный фермент, *б* — форма КО-1, *в* — форма КО-2

которого в реакционной смеси сначала повышается, а затем снижается. Таким образом, цепь D — промежуточный, сравнительно нестабильный продукт протеолиза. В ходе протеолиза химотрипсином образуются также фрагменты В' (*M* 120 000), С' (*M* 84 000) и дополнительные компоненты (диффузные минорные полосы), локализованные на электрофореграмме между цепями Е и F (рис. 2, б).

На рис. 5, *a, б* показаны изменения относительных молярных концентраций отдельных продуктов протеолиза в зависимости от времени инкубации с химотрипсином. Рис. 5, *a* показывает, что распад цепей А и накопление цепей С происходит экспоненциально с одной и той же константой скорости $k_1 = 3,2 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$, причем предельная концентрация цепей С равна начальной концентрации цепей А (рис. 5, *a*). Сумма молекулярных весов цепей С и D примерно равна молекулярному весу цепи А, поэтому можно предположить, что цепь А расщепляется на цепь С и D.

Поскольку молекулярный вес цепей D примерно равен сумме молекулярных весов цепей Е и F, можно также предположить, что при расщеплении цепей D образуются цепи Е и F. Рассчитанная для расщепления цепей D химотрипсином кинетическая кривая совпадает с экспериментальной кривой при значении k_2 , равном $5,4 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$.

В отличие от трипсина, химотрипсин не превращает цепи А в цепи В. Небольшое количество цепей В, которое имелось в исходном препарате, при действии химотрипсина медленно расщеплялось по экспоненте с константой скорости $k_3 = 1,9 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$. Продукты этого расщепления трудно идентифицировать по одним лишь кинетическим данным. Очень вероятно, что цепи В расщепляются химотрипсином на два фрагмента, один из которых является цепью Е.

Электрофоретические картины продуктов протеолиза, полученные при действии трипсина или химотрипсина в течение 24 ч, практически совпадают (рис. 2, *a, б*). Продукты протеолиза содержат в основном цепи С, Е и F и несколько минорных компонентов. Те же продукты протеолиза были

выявлены у ксантиноксидазы, хранившейся в холодильнике в течение 1 года [2], а также у свежевыделенной ксантиноксидазы, подвергнутой протеолизу субтилизином А в течение 3 ч при рН 8 (весовое отношение ксантиноксидаза/субтилизин 100 : 1).

Модификация ксантиноксидазы трипсином, химотрипсином или субтилизином при рН 8 до фрагментов С, Е и F не влияет на ее спектр поглощения в видимой области, на ксантиноксидазную активность, а также на перенос электронов от ксантина к другим акцепторам (тетранитротетразолий синий, ФМС, индофенол). При электрофорезе продуктов протеолиза ксантиноксидазы в полиакриламидном геле в отсутствие ДСН (рис. 1) выявляется в основном один компонент, подвижность которого была несколько выше, чем у исходного фермента, и два минорных с меньшей подвижностью. Все эти компоненты обладают ксантиндегидрогеназной активностью.

Модифицированная ксантиноксидаза, состоящая из фрагментов С, Е и F, довольно резистентна к дальнейшему протеолизу при рН 8. Однако при высоких концентрациях протеаз, например трипсина (весовое отношение ксантиноксидаза/трипсин 10 : 1), фрагменты С (M 92 000) и Е (M 40 000) превращаются соответственно в С' (M 84 000) и Е' (M 35 000). Переход $E \rightarrow E'$ происходит, по-видимому, с образованием двух нестабильных промежуточных продуктов (рис. 2, з). При инкубации с химотрипсином фрагмент С также превращается в С' (рис. 2, б), при инкубации же с субтилизином А (10 : 1) этого не наблюдалось, но цепи Е в этом случае полностью расщеплялись через 24 ч до цепей Е' (рис. 2, в). На этой более глубокой стадии протеолиза фермент также сохраняет ксантиноксидазную активность.

Известно, что ксантиноксидаза, выделенная с применением панкреатина [9, 10], подвергается ограниченному протеолизу в процессе выделения и по электрофоретическим данным (число полипептидных цепей) сходна с той формой, которая содержит цепи С', Е' и F [8]. Молекулярный вес ксантиноксидазы, выделенной с использованием панкреатина, равен $275\ 000 \pm 30\ 000$ [11], а без применения протеаз — 300 000 [1]. Эти данные показывают, что при ограниченном протеолизе до цепей С', Е', F и тем более до С, Е, F эти крупные фрагменты в составе молекулы фермента остаются связанными друг с другом. На то же указывают данные электрофореза: фермент, обработанный трипсином в течение 24 ч, движется при электрофорезе в отсутствие ДСН одной полосой (рис. 1).

Из приведенных выше данных следует, что различные протеазы довольно быстро превращают нативную ксантиноксидазу, которая является димером цепей А в форму, состоящую из цепей С, Е, F и сохраняющую молекулярный вес, близкий к исходному ($\sim 300\ 000$). Поскольку сумма молекулярных весов цепей С, Е и F близка к молекулярному весу цепи А, можно предположить, что протеазы расщепляют цепь А в двух местах с образованием цепей С, Е и F, в результате чего образуется форма ксантиноксидазы, имеющая строение $C_2E_2F_2$ (форма КО-1).

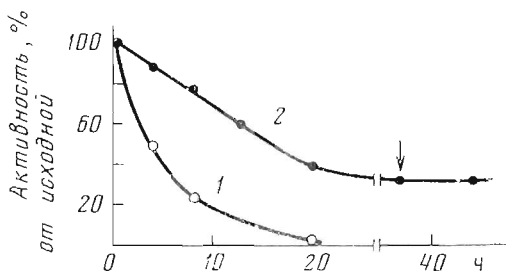
В чистом препарате КО-1 соотношение молярных концентраций цепей С, Е и F должно быть равно 1 : 1 : 1. Однако, по нашим данным, после ограниченного протеолиза ксантиноксидазы до цепей С, Е, F соотношение молярных концентраций Е/С варьирует от 1,2 до 1,9. Это согласуется с тем, что часть цепей С подвергается дальнейшему расщеплению и в результате протеолиза образуется, вероятно, смесь различных продуктов, а не однородный препарат КО-1.

Если цепь А состоит из фрагментов С, Е и F, то для расположения этих фрагментов в исходных цепях А возможны три варианта: 1) CEF, 2) CFE, 3) ECF. Если цепь А расщеплена только в одном месте, то в 1-м случае будут образовываться фрагменты CE (M 132 000) и EF (M 60 000), во 2-м фрагменты CF (M 112 000) и FE (M 60 000) и в 3-м фрагменты EC (M 132 000) и CF (M 112 000). Нами было показано, что цепи В (M 135 000)

и D (M 60 000) являются промежуточными продуктами протеолиза и, по-видимому, их можно рассматривать соответственно как фрагменты SE и EF. В то же время цепи с молекулярным весом 112 000 (вариант 2 и 3) не были обнаружены среди основных промежуточных продуктов протеолиза. Таким образом, вероятнее всего, что в исходных цепях А ксантиноксидазы фрагменты С, Е и F расположены в последовательности SEF (вариант 1).

Возникает также вопрос, почему протеазы с различной специфичностью легко расщепляют цепь А всегда в одних и тех же местах, тогда как остальные участки полипептидной цепи сравнительно резистентны к протеолизу? Мы предположили, что цепь А свернута не в одну, а в три глобулы, причем каждый из полипептидных фрагментов С, Е и F свернут

Рис. 7. Изменение ксантиноксидазной (1) и ксантин-ФМС-дегидрогеназной (2) активности при pH 11 в зависимости от времени. Ксантиноксидазу инкубировали в 0,2 М Na_2HPO_4 — NaOH буфере (pH 11); через определенные интервалы отбирали пробы и измеряли их активность в стандартных условиях. Стрелкой указано время добавления субстрата



в отдельную глобулу. Эти глобулы соединены между собой короткими выступающими участками (петлями) полипептидной цепи. В соответствии с этой моделью нативная ксантиноксидаза должна состоять из шести глобул (рис. 6, а), которые сравнительно резистентны к протеолизу, тогда как соединяющие их петли легко расщепляются протеазами. Глобулы С, Е и F, кроме того, должны взаимодействовать между собой непосредственно, так как после разрыва петель полипептидные цепи не диссоциируют.

Такая модель не является, конечно, единственно возможной. Так, можно предположить, что петля, легко подвергающаяся протеолизу, не соединяет две различные глобулы, а просто «высовывается» из нее. Примером может служить действие трипсина на стафилококковую нуклеазу [12].

Если допустить, что молекула ксантиноксидазы построена из нескольких глобул, образованных различными участками полипептидной цепи, то глобулы различного типа будут иметь, по-видимому, различную устойчивость к денатурации. В таком случае можно подобрать такие условия частичной денатурации, когда глобулы одного типа развернутся, а глобулы другого типа останутся в компактном состоянии. Если теперь в эту систему добавить протеазу, активную в данных денатурирующих условиях, то она полностью расщепит развернувшиеся участки полипептидной цепи, в то время как участки, сохраняющие глобулярную структуру, будут сравнительно резистентны к протеолизу.

Если же допустить, что ксантиноксидаза построена из глобул одного типа, то протеолиз в денатурирующих условиях всегда должен давать неизбирательное и полное переваривание цепей (при этом, однако, следует считать, что процесс разворачивания индивидуальной глобулы кооперативен и протекает по принципу «все или ничего»).

Описанные далее эксперименты, проведенные в соответствии с этими рассуждениями показали, что ксантиноксидаза построена из нескольких глобул различных типов.

Был исследован протеолиз ксантиноксидазы в различных условиях, вызывающих частичную денатурацию фермента. При инкубации ксантиноксидазы с папаином в 2 М гуанидин-НСI или с субтилизином в 8 М мочеvine происходила лишь неизбирательная постепенная деградация це-

пей С, Е и F. Было найдено также, что при увеличении рН среды спектральные и ферментативные свойства ксантиноксидазы оставались неизменными вплоть до рН 10,7, но при рН 11,0—11,2 ксантиноксидазная активность постепенно снижается и через сутки составляет примерно 5—6% от исходной (рис. 7). При этом происходит отделение FAD от фермента (появление флуоресценции свободного FAD). Однако оказалось, что даже

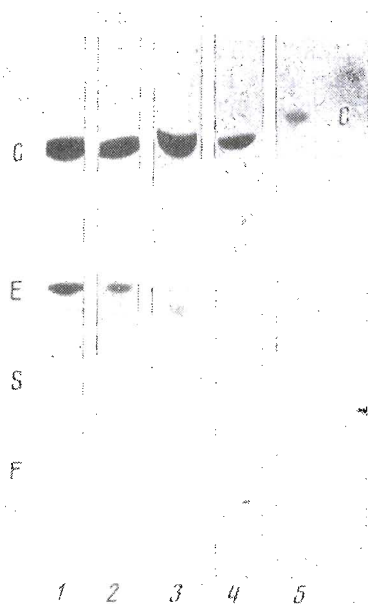


Рис. 8. Анализ продуктов протеолиза ксантиноксидазы субтилизином при рН 11 с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Весовое соотношение ксантиноксидаза/субтилизин 10 : 1. 1, 2, 3 — соответственно инкубация с субтилизином в течение 1,5 и 26 ч; 4 — фермент инкубировали предварительно 20 ч при рН 11 и затем расщепляли субтилизином в течение 3 ч; 5 — KO-2 после гель-фильтрации. Условия протеолиза те же, что и для кривой 4. После гель-фильтрации к образцу добавляли ДСН до концентрации 2% и меркаптоэтанол — 5%; образец нагревали 5 мин при 100° и подвергали электрофорезу (S — субтилизин)

после длительной (24 ч и более) инкубации при рН 11,0 способность фермента переносить электроны от ксантина на другие акцепторы сохраняется (рис. 7).

Для протеолиза ксантиноксидазы при рН ~11 был использован субтилизин А — сериновая протеаза, сходная с химотрипсином по специфичности и состоящая из одной полипептидной цепи с M 27 630 [13]. Субтилизин сохраняет активность в присутствии ДСН [14], в 10 М мочевины, в 6 М гуанидин-НСI [15] и при высоких значениях рН, но нестабилен при рН < 4 [16].

Как видно из рис. 8, гели 1—3, в процессе протеолиза ксантиноксидазы субтилизином при рН 11,0 количество цепей Е постепенно уменьшается, и после 26 ч протеолиза остаются в основном только цепи С. Из рис. 8 видно также, что содержание субтилизина в реакционной смеси уменьшается со временем в результате автолиза.

Если ксантиноксидазу предварительно инкубировать при рН 11,0 в течение 15—20 ч, а затем добавить субтилизин, то цепи Е исчезают практически полностью за 2—3 ч (рис. 8, 4). Цепи F, по-видимому, подвергаются дальнейшему протеолизу, но не исчезают полностью.

Ферментативно-активный фрагмент ксантиноксидазы (форма KO-2), образующийся в результате действия на фермент субтилизина при рН 11, сохраняет способность окислять ксантин в присутствии искусственных акцепторов (тетранитротетразолий синий, ФМС, индофенол), но не способен переносить электроны на кислород. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) участки молекулы ксантиноксидазы, в который входят фрагменты С, образует одну или несколько глобул, не содержащих фрагмент Е; глобулы, содержащие цепи С (форма KO-2), сохраняют стабильность в отсутствие фрагментов Е; 2) участок ксанти-

ноксидазы, в который входят фрагменты E, образует денатурирующие при pH 11 глобулы другого типа, в состав которых не входят фрагменты C.

Для очистки KO-2 от низкомолекулярных фрагментов и оценки ее молекулярного веса фермент после переваривания субтилизинном подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-200. Было показано (рис. 9, а) что фракции, соответствующие пикам I и II, обладают ксантин-ФМС-дегидро-

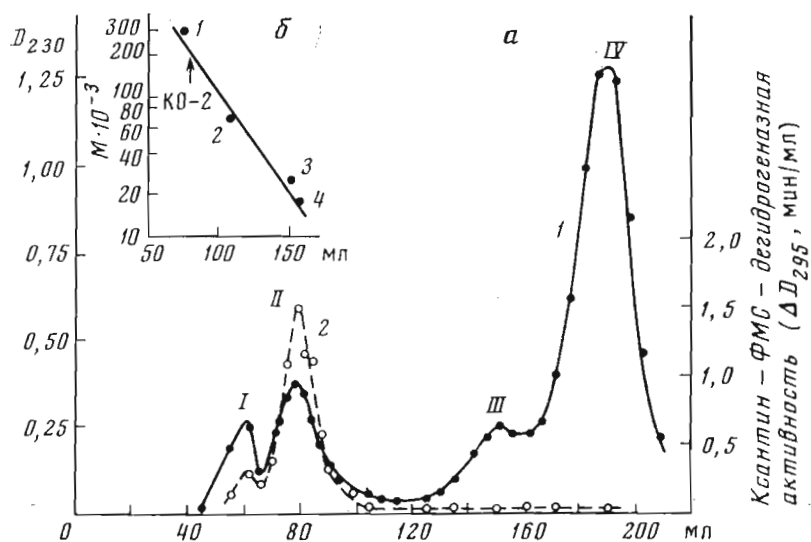


Рис. 9. Гель-фильтрация продуктов протеолиза ксантиноксидазы субтилизинном при pH 11 (а) и определение молекулярного веса KO-2 (б). Фермент инкубировали при pH 11 20 ч при 30°, затем добавляли субтилизин и через 3 ч смесь наносили на колонку с сефадексом G-200 (37×2,5 см), уравновешенную 0,1 М трис-HCl буфером (pH 8). а: 1 — поглощение при 230 нм; 2 — ксантин-ФМС-дегидрогеназная активность; б: 1 — исходная ксантиноксидаза, 2 — бычий сывороточный альбумин, 3 — субтилизин А, 4 — миоглобин лошади

геназной активностью. Объем элюата, соответствующий пику I, равен объему элюата голубого декстрана; этот пик является, по-видимому, полимерной формой KO-2. Объем элюата пика II соответствует молекулярному весу $\sim 200\ 000$ (рис. 9, б). Пик III представляет собой субтилизин, поскольку фракции, соответствующие этому пику, обладают протеолитической активностью по отношению к гемоглобину. С объемом элюата, близким к объему элюата динитрофенилаланина, элюируются, по-видимому, пептиды с $M \sim 10\ 000$ (пик IV). Фракции пиков I и II анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем ДСН. Было установлено, что оба пика движутся в основном одной полосой — цепь C с молекулярным весом $M\ 92\ 000$ (рис. 8, 5). В некоторых опытах при электрофорезе в пике II кроме полосы C обнаруживался низкомолекулярный материал. Так как форма KO-2 (пик II) имеет $M \sim 200\ 000$, то можно сделать вывод, что молекула KO-2 содержит две цепи C и, возможно, низкомолекулярные фрагменты полипептидных цепей.

При электрофорезе KO-2 в отсутствие ДСН обнаруживаются 4 полосы (рис. 1). Три из этих полос, кроме самой медленной, обладают ксантин-дегидрогеназной активностью.

Очищенный препарат KO-2 содержал фактор, восстанавливающий нитратредуктазную активность при смешивании с экстрактом мутанта *nit-1 Neurospora crassa*, дефектного по нитратредуктазе. Это указывает на то, что KO-2 содержит молибден [17, 18]. Действительно в очищенном препарате KO-2 полярографическим методом [19] был обнаружен молиб-

ден *. О наличии молибдена в КО-2 свидетельствует также то, что КО-2 способна окислять ксантин; эта способность приписывается каталитическому центру ксантиноксидазы, содержащему молибден [20, 21].

Способность ксантиноксидазы переносить электроны на молекулярный кислород связана с наличием FAD [21]. Как уже указывалось, денатурация глобул E ксантиноксидазы при pH 11 сопровождалась отщеплением FAD. Очищенный препарат КО-2, не содержащий цепей E, не был способен переносить электроны на молекулярный кислород даже после инкубации со свободным FAD. Поэтому можно предположить, что в нативной ксантиноксидазе FAD связывается с глобулами типа E.

Таким образом, данные, приведенные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что ксантиноксидаза имеет полиглобулярную структуру. К такому же выводу можно прийти и из более общих соображений. Ксантиноксидаза содержит кофакторы различной природы: каталитический центр неизвестного строения, содержащий молибден, FAD и негеминное железо, которое, судя по его оптическим свойствам, может быть организовано в виде кластеров ферредоксинового типа [21]. Ферменты, содержащие такие кофакторы (молибдопротеиды [22], флавопротеиды, другие пуклеотидсвязывающие белки [23], железо-серные белки [24]), имели, несомненно, отдельные пути эволюции. В результате эволюции в настоящее время существуют семейства гомологичных белков, имеющих сходную функцию и сходное пространственное строение. Следовательно, в молекуле ксантиноксидазы каждый из этих трех типов кофакторов должен размещаться на «своей» отдельной глобуле. Известно, что в процессе эволюции может происходить слияние полипептидных цепей различных белков вследствие слияния соответствующих генов [25]. Такое происхождение могут иметь и цепи ксантиноксидазы.

Сравнение известных пространственных структур белков показывает, что глобулярные белки с достаточно длинными полипептидными цепями обычно содержат несколько компактных участков (ядер), причем одно такое ядро содержит только 40—150 аминокислот [26]. Кроме того, известно много белков, в которых одна полипептидная цепь свернута в несколько глобул, например, ДНК-полимераза I из *E. coli* [27], иммуноглобулины [28] и целый ряд других белков [29—33]. В некоторых случаях связь между глобулами легко разрывается под действием протеолитических ферментов, как, например, в ДНК-полимеразе [27], иммуноглобулинах [28], цитохроме b_2 [31]. Таким образом, эти факты показывают, что свертывание длинных полипептидных цепей в несколько глобул является распространенным явлением.

Экспериментальная часть

Ксантиноксидазу выделяли без обработки панкреатином по модифицированному нами методу Харта и соавт. [34]. Основные отличия заключались в следующем: 1) фермент выделяли из сливок, в которые предварительно добавляли 1,5 г/л ЭДТА, 1 г/л салицилата натрия и цистеин до концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М. Раствор охлаждали до 5—10° и после центрифугирования в течение 1,5 ч отделяли масло; 2) стадия переваривания панкреатином была опущена; 3) белки молока осаждали в две стадии: вначале добавляли бутанол (143 мл/л) и сульфат аммония (150 г/л), осадок отбрасывали, затем вновь добавляли 40 г/л сульфата аммония и осадок отбрасывали. Осадок, содержащий фермент, получали при последующем добавлении сульфата аммония (80 г/л); 4) фермент очищали хроматографией на колонке с гидроксилпатитом (Neo Cel, фирма «Serva», ФРГ), уравновешенном 0,1 М фосфатным буфером (pH 6,8), содержащим 10^{-3} М ЭДТА.

* Опыты с экстрактом мутанта *nit-1* и определение молибдена в препарате КО-2 были любезно проведены Н. П. Львовым (Институт биохимии АН СССР, Москва).

Этим же буфером удаляли бесцветную примесь. Фермент элюировали 0,1 М фосфатным буфером (рН 6,8), содержащем 5% сульфат аммония и 10^{-3} М ЭДТА. Далее фермент очищали фильтрацией через колонку с сефадексом G-200.

Оксидазную активность ксантинооксидазы определяли спектрофотометрически при 295 нм по превращению ксантина в мочевую кислоту [35].

Дегидрогеназную активность измеряли в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М ксантина; в качестве акцепторов использовали: О-крезол-2,6-дихлорфенолиндофенол («Chemarol», ЧССР), измеряли уменьшение поглощения при 600 нм; тетранитротетразолий синий (фирма «Reanal», Венгрия), измеряли увеличение поглощения при 535 нм; ФМС (фирма «Schuchardt», ФРГ), измеряли увеличение поглощения при 295 нм [36].

Протеолиз ксантинооксидазы проводили при рН 8 в 0,1 М трис-НСI буфере или при рН 11—11,2 в 0,2 М Na_2HPO_4 — NaOH буфере. Протеолиз папаином проводили в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ М цистеина и 10^{-3} М ЭДТА. Протеолиз останавливали добавлением ТХУ до концентрации 5%. Для протеолиза использовали трипсин (фирма «Reanal», Венгрия), обработанный ингибитором химотрипсина — хлорметилкетон-тозил-L-фенилаланином [37], химотрипсин (препарат отечественного производства, Ленмисокомбинат), обработанный ингибитором трипсина — хлорметилкетон-N α -тозил-L-лизинном [38], субтилизин А (фирма «Serva», ФРГ) и папаин (фирма «Fluka», Швейцария).

Электрофорез в присутствии ДСН проводили в 5%-ном геле по методу Вебера и Осборна [5] или в 10%-ном геле по методу Леммли [6]. Приготовление образцов: раствор белка осаждали 5%-ной ТХУ, осадки промывали 80%-ным (объем на объем) водным ацетоном, суспендировали в 0,0625 М трис-НСI буфере, содержащем 1% ДСН, 5% меркаптоэтанол, суспензию инкубировали 15—17 ч при 30° и затем нагревали 2—3 мин при 100°. После электрофореза гели фиксировали в 20%-ной ТХУ в течение 15—17 ч и окрашивали кумасси синим (фирма «Schuchardt», ФРГ) по методу Уорда [39].

Электрофорез без ДСН проводили в 7,5%-ном геле по методу Дэвиса [40]. Верхний гель не применяли. Белковые полосы выявляли окрашиванием кумасси синим. Ферментативно-активные компоненты обнаруживали по ксантиндегидрогеназной активности: гели инкубировали 15 мин при 30° в 0,1 М трис-НСI буфере (рН 8), содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ М ксантина и 1 мг/мл тетранитротетразолия синего; затем гели промывали водой, фиксировали в 5%-ной ТХУ в течение 30 мин и хранили в воде.

Денситометрирование гелей, окрашенных кумасси синим, проводили при 565 нм (интерференционный светофильтр) с помощью модифицированного микрофотометра МФ-4, снабженного логарифмирующей приставкой и самописцем ЭПП-09 [41]. Относительную молярную концентрацию полипептидной цепи определяли как отношение площади под соответствующим пиком, выраженной в процентах от суммарной площади всех пиков, к молекулярному весу этой цепи.

Авторы благодарны Н. М. Эмануэлю за поддержку этих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson C. A., Handler Ph. (1968) J. Biol. Chem., 243, 5368—5373.
2. Наглер Л. Г., Вартамян Л. С. (1973) Докл. АН СССР, 212, 1461—1464.
3. Massey V., Brumby P. E., Komai H. (1969) J. Biol. Chem., 244, 1682—1691.
4. Bray R. C. (1963) The Enzymes, 7, 533.
5. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
6. Laemmli U. K. (1970) Nature, 227, 680—685.
7. Kaminogawa S., Mizobuchi H., Yamauchi K. (1972) Agr. and Biol. Chem., 36, 2163—2167.
8. Наглер Л. Г., Вартамян Л. С. (1973) Биохимия, 38, 561—567.
9. Ball E. G. (1939) J. Biol. Chem., 128, 51—67.
10. Gilbert D. A., Bergel F. (1964) Biochem. J., 90, 350—353.

11. Andrews P., Bray R. C., Edwards P., Shooter K. V. (1964) *Biochem. J.*, **93**, 627—632.
12. Anfinsen C. B. (1973) *Science*, **181**, 223—230.
13. Smith E. L., DeLange R. J., Evans W. H., Landon M., Markland F. S. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 2184—2189.
14. Gounaris A., Ottesen M. (1965) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **35**, 37.
15. Stauffer C. E., Sullivan J. F. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **251**, 407—412.
16. Güntelberg A. V., Ottesen M. (1954) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **29**, 36.
17. Nason A., Lee K. I., Pan S. S., Ketchum P. A., Lamberti A., DeVries J. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 3242—3246.
18. Мак Кенна Ч., Львов Н. П., Гавелин В. Л., Сергеев Н. С., Кретович В. Л., (1974) *Докл. АН СССР*, **217**, 228—231.
19. Кузнецов Б. А., Якушева М. И., Львов Н. П. (1972) *Прикл. биох. и микробиол.*, **8**, 232—237.
20. Bray R. C., Palmer G., Beinert H. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2667—2676.
21. Komai H., Massey V., Palmer G. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1692—1700.
22. Eady R. R., Postgate J. R. (1974) *Nature*, **249**, 805—809.
23. Rossman M. G., Moras D., Olsen K. W. (1974) *Nature*, **250**, 194—199.
24. Mason R., Zubieta J. A. (1973) *Angew. Chem.*, **85**, 390—400.
25. Truffa-Bachi P., Cohen G. N. (1973) *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 113—134.
26. Wetlaufer D. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 697—701.
27. Setlow P., Brutlag D., Kornberg A. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 224—231.
28. Edelman G. M. (1973) *Science*, **180**, 830—844.
29. Blake C. C. F., Evans P. R., Scopes R. K. (1972) *Nature New Biol*, **235**, 195—198.
30. Steitz T. A., Fletterick R. J., Hwang K. J. (1973) *J. Mol. Biol.*, **78**, 551—561.
31. Guiard B., Growdinsky O., Lederer F. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3539—3543.
32. Raiband O., Goldberg M. E. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5154—5161.
33. Véron M., Falcoz-Kelly F., Gohen G. N. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **28**, 520—527.
34. Hart L. J., McGartoll M. A., Chapman R., Bray R. C. (1970) *Biochem. J.*, **116**, 851—864.
35. Avis P. G., Bray R. C., James D. W. F., Shooter K. V. (1956) *J. Chem. Soc.*, 1219—1226.
36. Kanda M., Brady F. O., Rajagopalan K. V., Handler Ph. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 765—770.
37. Kostka V., Carpenter F. H. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 1799—1803.
38. Shaw S., Mares-Guia M., Gohen W. (1965) *Biochemistry*, **4**, 2219—2224.
39. Ward S. (1970) *Analyt. Biochem.*, **33**, 259—262.
40. Davis B. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, Art. 2, 404—427.
41. Мамаев В. Б., Обухова Л. К., Тимофеев В. П. (1973). Труды семинара по электрофорезу в полиакриламидном геле. М., 55—58.
42. King J., Laemmli U. K. (1971) *J. Mol. Biol.*, **62**, 465—477.
43. King J., Laemmli U. K. (1973) *J. Mol. Biol.*, **75**, 315—337.

Поступила в редакцию
6.1.1975

**POLYGLOBULAR STRUCTURE OF MILK XANTHINE OXIDASE
AS REVEALED BY THE LIMITED PROTEOLYSIS.
ISOLATION OF A FRAGMENT DEVOID OF FAD AND RETAINING THE
XANTHINE DEHYDROGENASE ACTIVITY**

NAGLER L. G., ANDREEV V. M., VARTANYAN L. S.

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The molecular weight and activity of bovine milk xanthine oxidase (XO) were shown to be rather insensitive to trypsin, chymotrypsin or subtilisin action at pH 8.0, whereas both of its A chains were cleaved into C, E and F fragments having molecular weights of 92 000, 40 000 and 15 000-20 000, respectively. These fragments are bound to each other non-covalently and are relatively resistant to subsequent proteolysis whose kinetics are indicative of the C-E-F fragment arrangement in the intact A chain. A model is suggested for native XO in which C, E and F fragments form separate globules interconnected by short polypeptide loops easily accessible to proteases. At pH 11 subtilisin causes the complete digestion of E chains, as well as FAD liberation and total loss of xanthine: O₂ oxidoreductase activity, whereas xanthine: indophenol oxidoreductase activity is slightly affected. The active fragment has the molecular weight of about 200 000, consists mainly of two chains C, contains molybdenum and is deprived of FAD.