



УДК 577.112.088.52

© 1990 г.

А. В. Тепляков, И. П. Курянова, Э. Г. Арутюнян,
К. Фроммель *, В. Хене *

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ТЕРМИТАЗЫ И СТАБИЛЬНОСТЬ СУБТИЛИЗИНОВ

Институт кристаллографии АН СССР, Москва;

*Институт биохимии Университета Гумбольдта, Берлин

Методом рентгеноструктурного анализа при разрешении 1,4 Å определена кристаллическая структура термитазы, сериновой протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris*. Структура определена объединенным методом молекулярного и изоморфного замещения с использованием атомной модели субтилизина BPN'. Уточненная структура термитазы содержит 1997 неводородных атомов белка, 182 молекулы воды и 2 иона Ca²⁺.

Ход полипептидной цепи в молекуле термитазы в целом соответствует третичной структуре других субтилизинов. Ядро молекулы образует 8-цепочечный параллельный β-слой, окруженный четырьмя длинными α-спиралями. Наиболее существенные различия в третичной структуре термитазы и субтилизина BPN' связаны со вставками и делециями в аминокислотной последовательности, расположенными на поверхности молекулы. Сравнение с субтилизином BPN' позволяет со структурных позиций объяснить более высокую стабильность термитазы. Предполагается, что наиболее существенный вклад в стабилизацию структуры вносят ионы Ca²⁺, а также ионные и гидрофобные взаимодействия.

Термитаза (КФ 3.4.21.14) является бактериальной внеклеточной сериновой протеиназой, выделенной из *Thermoactinomyces vulgaris* [1]. Молекула термитазы представляет собой мономер с молекулярной массой 28380 Да, рассчитанной по известной аминокислотной последовательности [2]. Первичная структура термитазы гомологична бактериальным субтилизином: 42% остатков совпадают с субтилизином BPN' из *Bacillus amyloliquefaciens* [3] и 44% остатков — с субтилизином Carlsberg из *B. licheniformis* [4]. Термитаза принадлежит к группе субтилизинов со свободным остатком цистеина в активном центре. В нее также входят протеиназа К из гриба *Tritirachium album* [5], термомоноклин из *Malbranchea pulchella* [6] и щелочные протеиназы из *B. thuringiensis* [7] и *B. cereus* [8].

Сериновые протеиназы — классические образцы конвергентной эволюции ферментов двух семейств: химотрипсина и субтилизинов, имеющих одинаковый каталитический механизм, но совершенно различную пространственную структуру. Многочисленные исследования комплексов этих ферментов с различными ингибиторами позволили объяснить механизм катализа и специфичность ферментов со структурных позиций [9, 10]. Новая волна интереса к субтилизином вызвана их использованием в качестве добавок к стиральным порошкам и необходимостью повышения их стабильности, в первую очередь термической устойчивости. Успехи белковой инженерии позволили осуществлять направленные мутации субтилизинов, главным образом субтилизина BPN', однако отсутствие общей теории стабильности белков отрицательно сказывается на результатах. Исследование термитазы как более стабильного по сравнению с субтилизином BPN' представителя семейства и сопоставление их пространственных структур могли бы способствовать выяснению молекулярных основ стабильности субтилизинов.

В настоящее время известны кристаллические структуры трех субтилизинов, уточненные при высоком разрешении: субтилизина BPN' [11,

Сокращения: ТРМ — термитаза, СБТ — субтилизин BPN', СБС — субтилизин Carlsberg, ЦРК — протеиназа К.

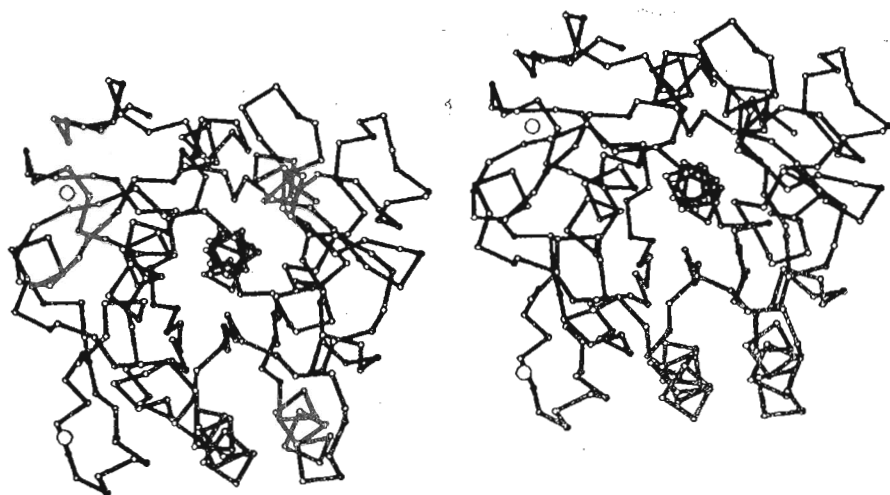


Рис. 1. Стереобразение полипептидной цепи молекулы ТРМ вдоль спирали F . Показаны положения ионов Ca^{2+} , связанных с белком

12], Carlsberg [13, 14] и протеиназы К [15]. Кристаллическая структура термитазы была определена нами сначала при разрешении 2,5 Å [16] с использованием неуточненной атомной модели субтилизина BPN' [17], единственной в то время опубликованной структуры субтилизина. Затем на основе нового дифракционного эксперимента атомная модель термитазы была уточнена при разрешении 1,4 Å. В данной статье мы приводим результаты этого уточнения и сравнение с моделью субтилизина BPN' [11] с целью выяснения структурных основ повышенной стабильности термитазы.

Атомная модель термитазы содержит 1997 атомов белка, 182 молекулы воды и 2 иона Ca^{2+} . Среднеквадратичное отклонение длин связей от стандартных значений составляет 0,015 Å. Основываясь на различных методах оценки ошибки в положениях атомов и учитывая результаты, полученные для других хорошо уточненных структур, можно заключить, что средняя ошибка в положениях атомов белка не превышает 0,1 Å.

В результате уточнения установлено положение всех 279 аминокислотных остатков, за исключением атомов боковых цепей Lys^{128} и Gln^{186} , начиная с C^6 , которые не удалось локализовать на картах электронной плотности. Для всех остальных остатков электронная плотность однозначно определяет положения атомов. Основываясь на ней, в двух местах опубликованная аминокислотная последовательность [2] исправлена: Val^{199} заменен на Trp , а Trp^{208} на Ser .

Среднеквадратичное отклонение двугранных углов ω пептидных связей от стандартных значений составляет 2,9°. Два остатка находятся в *цис*-конформации: Pro^{172} и Thr^{215} . Остаток *цис*- Pro^{172} , обнаруженный во всех субтилизинах, участвует в формировании обратного поворота цепи и Ca^{2+} -связывающего центра, общего для различных субтилизинов. Thr^{215} образует обратный поворот в β -шпильке на поверхности молекулы. В субтилизине Carlsberg этот остаток Thr также находится в *цис*-конформации. В субтилизине BPN' и протеиназе К эквивалентный остаток Gly имеет обычную *транс*-пептидную связь, хотя и находится в том же положении в β -шпильке.

Для сравнения пространственных структур термитазы и субтилизина BPN' была использована модель последнего [11] из Банка белковых данных [18], уточненная до $R = 0,154$ при разрешении 2,1 Å. Точность в положениях атомов этой модели составляет примерно 0,15 Å, т. е. сравнима с точностью модели термитазы.

Третичная структура. Укладка полипептидной цепи в молекуле термитазы (рис. 1) соответствует известным пространственным структурам других субтилизинов. Ядро молекулы фермента образует сильно скручен-

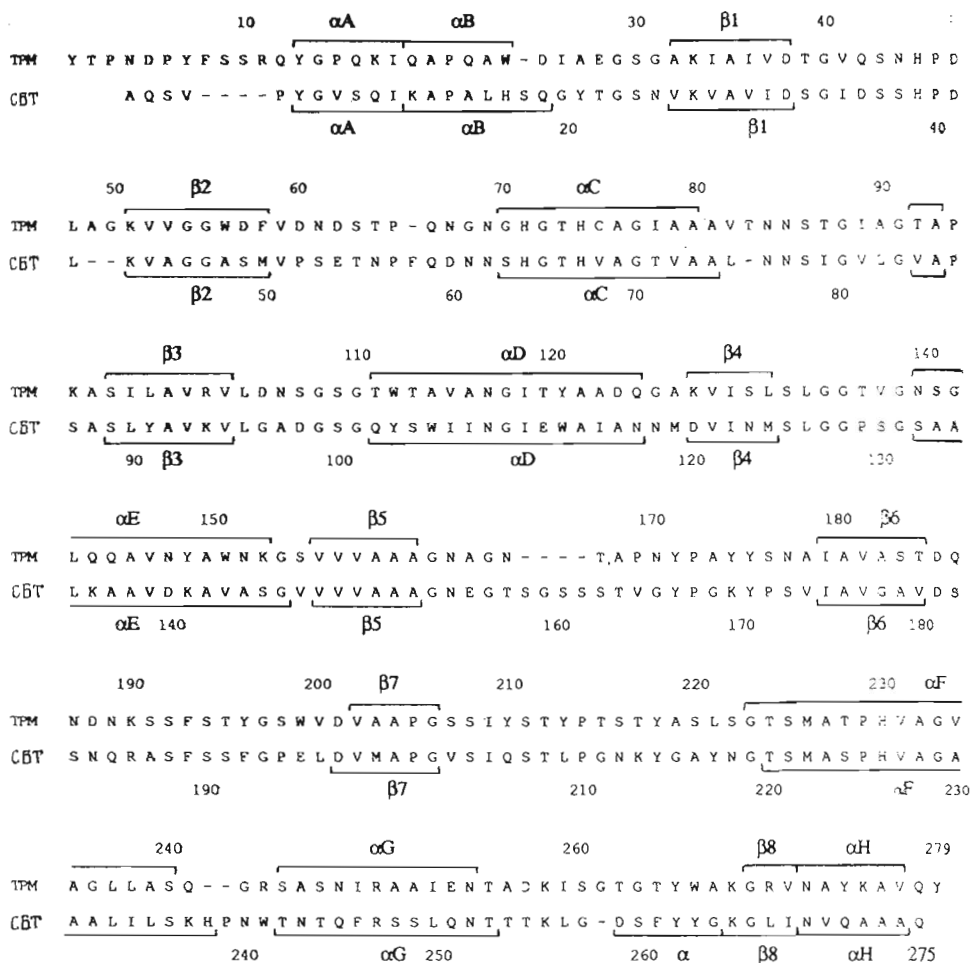


Рис. 2. Аминокислотные последовательности ТРМ и СВТ, совмещенные на основе сравнения пространственных структур. Отмечены фрагменты последовательности, соответствующие α -спиралям и параллельному β -слою. Спираль С состоит из двух фрагментов цепи

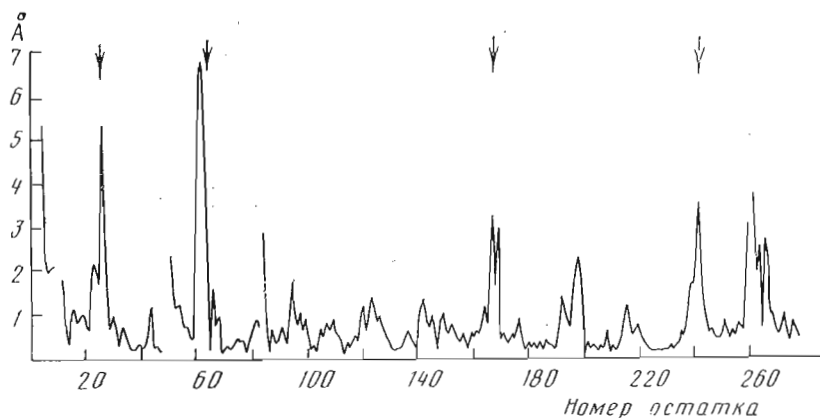


Рис. 3. Отклонения между структурно эквивалентными атомами C^{α} в ТРМ и СВТ. Стрелками обозначены места делеций в последовательности ТРМ. Вставки в последовательности показаны разрывами в графике

ный 8-цепочечный параллельный β -слой, окруженный α -спиралями, четыре из которых примерно антипараллельны β -цепям. β -Цепи, пронумерованные вдоль полипептидной цепи (рис. 2), расположены в β -слое в по-

рядке 2-3-4-5-6-7-8. Согласно классификации белков, предложенной в работе [19], термитаза относится к α/β -белкам.

Трехмерные структуры термитазы и субтилизина BPN' можно совместить методом наименьших квадратов по 267 общим атомам C^α со среднеквадратичным отклонением между ними 1,35 Å и максимальным отклонением 6,56 Å. Если теперь учитывать только атомы C^α с отклонениями менее 2 Å, что составляет примерно половину расстояния $C^\alpha-C^\alpha$ соседних остатков, то совмещение двух ферментов по оставшимся 227 атомам C^α дает среднеквадратичное отклонение 0,63 Å и максимальное отклонение 1,47 Å. Это совмещение позволяет установить структурно эквивалентные остатки в термитазе и субтилизине BPN' (рис. 2). Такое совмещение аминокислотных последовательностей этих двух молекул несколько отличается от приводившихся ранее. Отклонения эквивалентных атомов C^α в совмещенных структурах термитазы и субтилизина BPN' показаны на рис. 3 как функция номера остатка. Максимальные различия между структурами связаны со вставками и делециями остатков и расположены на поверхности молекулы.

В трех местах отклонения в главной цепи превышают 5 Å. N-Концевой фрагмент термитазы содержит 7 дополнительных остатков, которые вместе с Gln¹² образуют большое количество контактов с Ca^{2+} -связывающей петлей 82—90. Asp⁵ участвует в связывании иона Ca^{2+} вместо Gln² в субтилизине BPN'. Включение дополнительной заряженной группы в координационную сферу Ca^{2+} и наблюдаемые взаимодействия вокруг него свидетельствуют о стабилизирующей роли N-концевого фрагмента в связывании Ca^{2+} в термитазе.

Два других участка структуры термитазы, сильно отличающиеся от субтилизина, связаны с делециями в аминокислотной последовательности. Отсутствие Ser¹⁸ (в нумерации субтилизина) приводит к образованию спирали Z_{10} на конце α -спирали B (рис. 2) вместо регулярной α -спирали, наблюдаемой в субтилизине BPN'. Петля 59—65 в термитазе, предшествующая делеции Phe⁵⁸ (субтилизин BPN'), образует Ca^{2+} -связывающий центр, отсутствующий в субтилизине.

Еще пять участков структуры отличаются более чем на 2 Å. Два из них связаны с петлями 158—163 и 237—240 в субтилизине, отсутствующими в термитазе из-за делеции соответственно четырех и двух остатков (см. рис. 2). Три других участка имеют вставки в последовательности: Ala⁴⁹—Gly⁵⁰, Thr⁸³, Gly²⁶¹. Остатки 259—264 в термитазе образуют два последовательных обратных поворота цепи типа II с пептидной связью 261—262, участвующей в обоих поворотах. Этот s-образный изгиб цепи в термитазе заменяет α -спираль в субтилизине BPN'.

Вставки Ala⁴⁹—Gly⁵⁰ и Thr⁸³ приводят к минимально возможным изменениям конформации соседних участков цепи термитазы, играющих важную роль в поддержании третичной структуры. Остатки 51—58 образуют β -цепь 2 (рис. 2) параллельного β -слоя, а Asp⁴⁷ участвует в связывании Ca^{2+} . Thr⁸³ вставлен непосредственно в Ca^{2+} -связывающую петлю. Ala⁴⁹—Gly⁵⁰ образуют обратный поворот типа II, а вставка Thr⁸³ приводит к повороту плоскостей соседних пептидных связей, в результате чего Asn⁸⁴ и Ser⁸⁶ имеют положительные углы ϕ .

Интересно, что две из трех внутренних вставок в термитазе и дополнительные N-концевые остатки расположены вокруг одного из центров связывания Ca^{2+} и, следовательно, их эффект может быть кооперативным.

Вторичная структура. Анализ водородных связей главной цепи и конформационных углов ϕ и ψ позволил определить элементы вторичной структуры термитазы. Считалось, что водородная связь существует, если выполнялись следующие условия: расстояние N...O < 3,4 Å, H...O < 2,4 Å, углы N—O—C > 100°, N—H—O > 130°, H—O—C > 100°. Участки последовательности, соответствующие α -спиралям и параллельному β -слою, показаны на рис. 2.

В формировании β -структуры термитазы участвуют 65 остатков. Центральные β -слои содержат кроме 8 параллельных β -цепей по одной антипараллельной β -цепи с каждой стороны: по две водородные связи N...O

образуют остатки Asp⁵⁷ и Asp⁶², а также Asp²⁵⁷ и Arg²⁷⁰. Антипараллельные β-мостики, т. е. β-структуры, включающие в себя по две водородные связи, существуют, кроме того, между Gly¹³⁶ и Tyr¹⁷¹, Ser¹⁸³ — Asp¹⁸⁵ и Asn¹⁸⁹ — Ser¹⁹¹. Остатки 209—221 образуют β-шпильку с 6 водородными связями. В молекуле субтилизина присутствуют все указанные элементы β-структуры, за исключением β-мостика 57—62. Конформации этого фрагмента цепи, как отмечалось выше, существенно различаются в сравнимых белках. В термитазе эти остатки образуют центр связывания Ca²⁺.

В молекуле термитазы обнаружено 8 α-спиралей, каждая из которых содержит по крайней мере два последовательных α-спиральных поворота с водородными связями 5 → 1. Две спирали имеют отклонения от регулярного строения. Спираль *C* состоит из двух частей. Остатки 70—80 образуют регулярную α-спираль. Остатки 81—91 образуют петлю, выходящую на поверхность молекулы и связывающую Ca²⁺. Остатки 92—93 образуют последний виток спирали *C* со всеми ожидаемыми водородными связями. Спираль *F* содержит активный остаток Ser²²⁵, который образует большое количество водородных связей в активном центре молекулы. В результате в спирали вместо трех ожидаемых водородных связей 5 → 1 возникает водородная связь 4 → 1 Ala²²⁷ — His²³⁰.

Три α-спирали (*B*, *F* и *H*) переходят в спирали 3₁₀, каждая из которых содержит по два обратных поворота типа III. Спирали *A*, *D* и *E* заканчиваются одиночными обратными поворотами типа I, I и III соответственно. Всего же в структуре термитазы обнаружено 24 обратных поворота цепи, классифицированных согласно [20]. Все четыре поворота типа II содержат Gly в положении 3.

Активный центр. Все сериновые протеиназы содержат каталитические остатки Ser²²⁵, His⁷¹ и Asp³⁸ (в нумерации термитазы). Их одинаковое взаимное расположение обеспечивается различной третичной структурой ферментов семейства химотрипсина и субтилизинов. Для четырех субтилизинов с известной пространственной структурой наблюдается значительное сходство в геометрии активного центра и остатков, связывающих субстрат. Среднеквадратичное различие в положениях 24 атомов каталитических остатков термитазы и субтилизина BPN' составляет всего 0,18 Å.

Каталитическая триада (рис. 4) расположена в углублении на поверхности молекулы у края центрального β-слоя. Asp³⁸ является последним остатком β-цепи 1, а His⁷¹ и Ser²²⁵ расположены в начале α-спиралей *C* и *F*. Расстояния между активными остатками в термитазе следующие: His⁷¹ N^{e2}...Ser²²⁵ O^v — 2,94 Å, His⁷¹ N^{δ1}...Asp³⁸ O^{δ1} — 3,15 Å, His⁷¹ N^{δ1}...Asp³⁸ O^{δ2} — 2,66 Å (обозначения атомов даны согласно номенклатуре IUPAC — IUB [21]). Таким образом, водородные связи между этими остатками могут существовать, хотя ориентация боковой группы Ser²²⁵ относительно His⁷¹ далеко не идеальная для водородной связи. С протоном на His⁷¹ N^{e2} угол O^v—H—N^{e2} составляет 139,4°, с протоном на Ser²²⁵ O^v — 148,0°. Ser²²⁵ и Ser¹³³ образуют между собой две водородные связи O^v...O, замыкающие 10-членный цикл.

В отсутствие субстрата или ингибитора активный центр сильно гидратирован. Одна из молекул воды занимает положение карбонильного кислорода расщепляемой связи, так называемую оксианионную полость, образуя водородные связи с N^{δ2} Asn¹⁶³, O^v Ser²²⁵ и O^{v1} Thr²²⁴.

Остатки, участвующие в связывании субстрата, были определены в рентгеновских исследованиях комплексов субтилизинов с различными ингибиторами [22, 23]. Субстратсвязывающий центр в термитазе включает в себя две параллельные β-цепи: Gly¹⁰⁸ — Gly¹¹⁰ и Ser¹³³ — Gly¹³⁵, образующие 3-цепочечный антипараллельный β-слой с цепью субстрата. Сравнение со структурой субтилизина BPN' показывает, что субстратсвязывающие участки молекулы консервативны и по первичной и по третичной структуре. Среднеквадратичное различие в положениях 120 атомов главной цепи составляет 0,53 Å. Наблюдаемое сходство пространственных структур термитазы и субтилизина BPN' объясняет похожую субстратную специфичность этих ферментов.

Единственный остаток цистеина в молекуле термитазы расположен

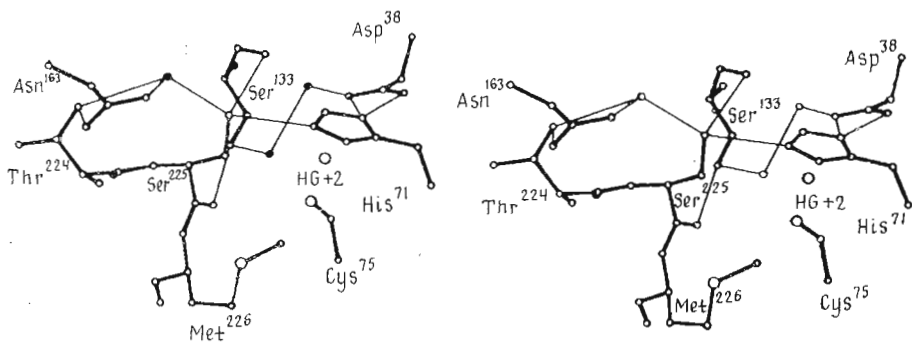


Рис. 4. Стереонизображение активного центра ТРМ. Показаны положения иона Hg^{2+} (HG + 2) в изоморфном производном ТРМ и некоторых молекул воды (затемненные кружочки). Тонкими линиями на этом и последующих рисунках показаны водородные связи и солевые мостики

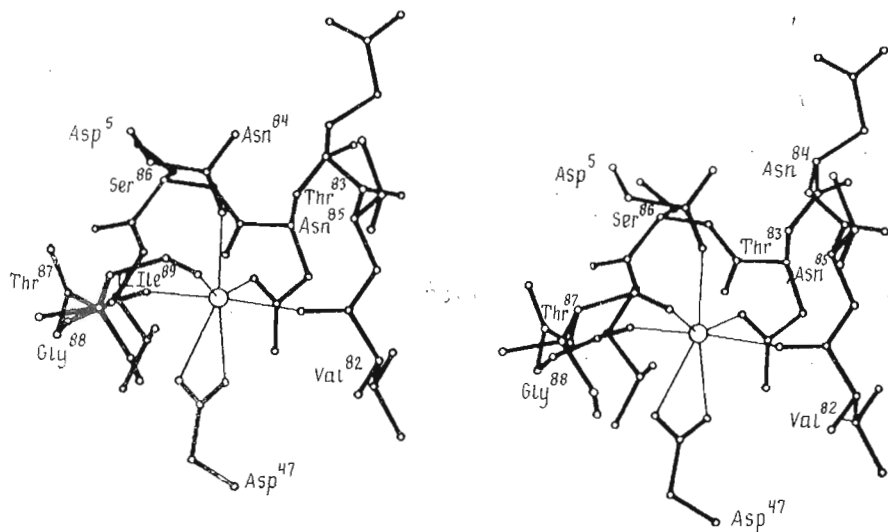


Рис. 5. Первый центр связывания Ca^{2+} (большой кружок) в ТРМ

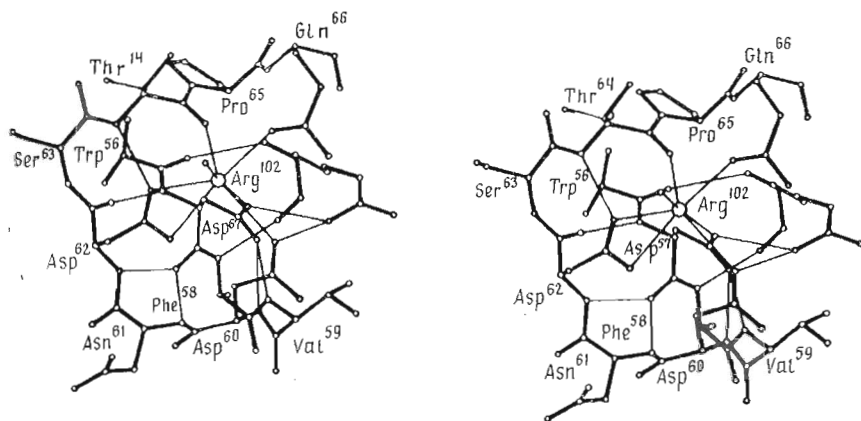


Рис. 6. Второй центр связывания Ca^{2+} (большой кружок) в ТРМ. Остатки 62, 57 и 102 образуют часть центрального β -слоя

в глубине активного центра и входит в состав спирали *C*. Расстояния от $S\gamma$ Cys⁷⁵ до $O^{\delta 1}$ Asp³⁸ (4,03 Å) и $N^{\delta 1}$ His⁷¹ (4,26 Å) слишком велики для образования водородных связей. В то же время нельзя исключить существование водородных связей $S\gamma \dots O$ Ser²²⁵ (3,51 Å) и $S\gamma \dots O\gamma$ Ser¹³³ (3,56 Å). Углы $O^{\delta 1} - S\gamma - O$ составляют 125° для Ser²²⁵ и 112° для Ser¹³³. Бли-

Координация ионов кальция в термитазе

Первый Ca ²⁺			Второй Ca ²⁺		
Лиганд		Расстояние, Å	Лиганд		Расстояние, Å
Asp ⁵	O ^{δ1}	2,30	Asp ⁵⁷	O ^{δ2}	2,41
Asp ⁴⁷	O ^{δ1}	2,43	Asp ⁶⁰	O ^{δ1}	2,89
Asp ⁴⁷	O ^{δ2}	2,59	Asp ⁶²	O ^{δ1}	2,51
Val ⁸²	O	2,36	Asp ⁶²	O ^{δ2}	2,69
Asn ⁸⁵	O ^{δ1}	2,45	Thr ⁶⁴	O	2,32
Thr ⁸⁷	O	2,29	Gln ⁶⁶	O ^{ε1}	2,49
Phe ⁸⁹	O	2,37	H ₂ O		2,30

зость свободной SH-группы к каталитически важным остаткам позволяет сделать заключение о возможности влияния этого цистеина на активность термитазы.

Хотя Cys⁷⁵ практически недоступен для растворителя, он связывает Hg²⁺ и в кристалле и в растворе. Положение иона Hg²⁺, ковалентно связанного с SH-группой Cys⁷⁵, показано на рис. 4. Связывание Hg²⁺ приводит к полной потере активности фермента [1].

Связывание ионов кальция. Все субтилизины содержат ионы Ca²⁺, стабилизирующие структуру против тепловой денатурации и протеолитической деградации. В кристаллических структурах субтилизинов BPN', Carlsberg и протеиназы К было обнаружено по два иона Ca²⁺. Необходимость Ca²⁺ в структуре может быть связана с функционированием этих ферментов только вне клетки, где концентрация Ca²⁺ существенно выше, чем внутри [24]. Эксперименты, проведенные на растворах термитазы [25], показывают, что молекула фермента может связывать три иона Ca²⁺, причем два из них сильнее, чем субтилизин BPN'. Третий ион Ca²⁺ в термитазе, видимо, соответствует слабо связанному Ca²⁺ в субтилизине, что подтверждается близкими константами диссоциации (10⁻⁴ М) и сходным стабилизирующим эффектом. В отличие от других субтилизинов один из ионов Ca²⁺ в термитазе невозможно удалить без денатурации фермента.

В кристаллической структуре термитазы обнаружены два иона Ca²⁺. Один из них расположен в петле остатков 82—89, прерывающей спираль С. Ca²⁺ связан с семью атомами О, образующими пентагональную бипирамиду (рис. 5). Расстояния до лигандов указаны в табл. 1. Этот ион Ca²⁺ совершенно недоступен для растворителя, поэтому, учитывая его более низкий температурный фактор, можно предположить, что это именно тот ион, который невозможно удалить из молекулы термитазы.

В этом же положении Ca²⁺ связывается в субтилизине BPN'. Вставки в аминокислотной последовательности термитазы вокруг центра связывания Ca²⁺ описаны выше. Наиболее существенна из них, видимо, замена Gln на Asp⁵ в координационной сфере Ca²⁺, приводящая к более сильному его связыванию.

Второй ион Ca²⁺ в термитазе расположен в петле 59—65 у края центрального β-слоя. Здесь сосредоточены отрицательно заряженные группы Asp⁵⁷, Asp⁶⁰ и Asp⁶², которые участвуют в связывании Ca²⁺ (рис. 6; табл. 1). Как и в первом случае, координация Ca²⁺ пентагонально-бипирамидальная. Во втором центре можно выделить два слоя взаимодействий. Один из них включает в себя водородные связи атомов главной цепи Asp⁶², Asp⁵⁷ и Arg¹⁰², образующих часть центрального β-листа, другой — взаимодействия между боковыми группами этих остатков и Ca²⁺. Участок цепи 59—65 имеет различные конформации во всех четырех субтилизинах. Ca²⁺ связывается только в термитазе.

На рис. 7 показан фрагмент структуры термитазы, соответствующий второму центру связывания Ca²⁺ в субтилизине BPN'. В этом же положении Ca²⁺ обнаружен также в субтилизине Carlsberg и протеиназе К,

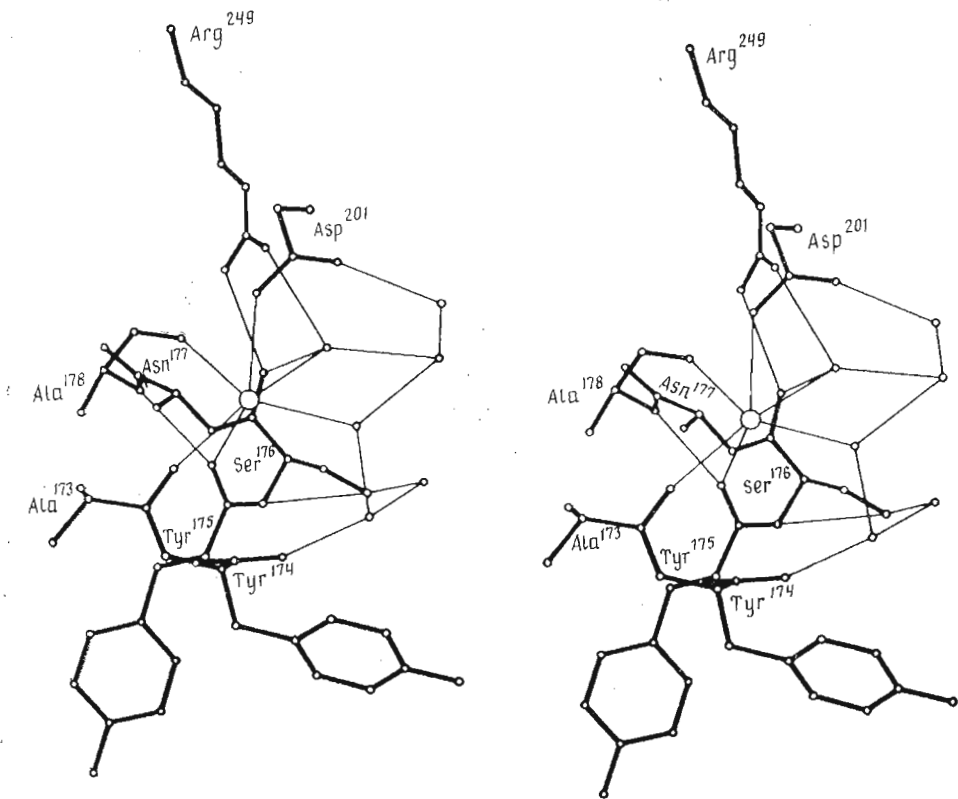


Рис. 7. Потенциальный третий центр связывания Ca^{2+} в ТРМ, занятый молекулой воды (показана большим кружком). Координация этой молекулы воды такая же, как Ca^{2+} в СБТ

В термитазе Ca^{2+} отсутствует, а его место занимает молекула воды, образующая водородные связи с карбонильными O Ala¹⁷³, Tyr¹⁷⁵ и Ala¹⁷⁸, карбоксильным O Asp²⁰¹ и двумя молекулами воды. Все расстояния лежат в интервале 2,80—2,97 Å. Октаэдрическая геометрия лигандов такая же, как в субтилизине BPN'. Отклонения в положениях соответствующих атомов не превышают 0,2—0,3 Å.

Таким образом, можно заключить, что при достаточном количестве Ca^{2+} в окружающей среде этот центр в термитазе может связывать Ca^{2+} аналогично субтилизину BPN'. Это предположение объясняет сходство в поведении этих двух ферментов при удалении слабо связанного иона Ca^{2+} . Отсутствие Ca^{2+} в кристаллической структуре можно объяснить тем, что кристаллы были получены из раствора, свободного от ионов Ca^{2+} .

Интересной особенностью второго и третьего центров связывания Ca^{2+} в термитазе является присутствие положительно заряженных групп Arg¹⁰² и Arg²⁴⁹, образующих водородные связи и ионные пары с лигандами Ca^{2+} (рис. 6 и 7). Остаток Arg²⁴⁷, эквивалентный Arg²⁴⁹, обнаружен в том же положении в субтилизине BPN'. Можно предположить, что заряженные группы необходимы для стабилизации этих фрагментов третичной структуры при недостатке Ca^{2+} в окружающей среде.

И в термитазе, и в субтилизине BPN' ионы Ca^{2+} стабилизируют участки поверхности молекулы, повышая термостабильность ферментов и препятствуя частичному разворачиванию цепи, необходимому для автолиза. Более высокая термостабильность термитазы во многом объясняется, на наш взгляд, существованием трех потенциальных центров связывания Ca^{2+} и включением дополнительных отрицательно заряженных групп в координационные сферы ионов Ca^{2+} .

Ионные взаимодействия. В ряде исследований [26, 27] отмечалась важная роль ионных взаимодействий в стабилизации структуры белков. Сравнение структур термитазы и субтилизина BPN' подтверждает это

Ионные взаимодействия в термитазе и субтилилизине BPN'

Гидрофобные взаимодействия в термитазе и субтилилизине BPN'

Ионная пара				Расстояние, Å	Остатки				Расстояние, Å
TPM					TPM				
Tyr ¹	N	Asp ²⁵	O ^{δ2}	2,88	Tyr ¹⁷⁵	Tyr ¹⁷¹		5,27	
Lys ⁹⁵	N ^ε	Glu ²⁸	O ^{ε2}	2,73	Tyr ¹⁷¹	Tyr ¹⁷⁴		5,71	
Arg ¹⁰²	N ^{η1}	Asp ⁵⁷	O ^{δ2}	2,97	Tyr ¹⁷⁴	Trp ¹⁹⁹		5,41	
Arg ¹⁰²	N ^{η1}	Asp ⁶⁰	O ^{δ1}	3,15	Tyr ¹	Trp ²⁴		5,38	
Lys ¹⁵³	N ^ε	Asp ¹²⁴	O ^{δ2}	3,19	Trp ²⁴	Phe ⁸		7,52	
Arg ²⁴³	N ^{η1}	Tyr ²⁷⁹	O	2,87	Tyr ⁷	Tyr ²¹⁰		5,43	
Arg ²⁴³	N ^{η2}	Tyr ²⁷⁹	O	2,77	Tyr ⁷	Tyr ²¹⁸		5,31	
Arg ²⁴⁹	N ^ε	Glu ²⁵³	O ^{ε2}	2,83	Tyr ²¹⁰	Tyr ²¹⁸		6,22	
Arg ²⁴⁹	N ^{η2}	Glu ²⁵³	O ^{ε2}	2,84	Trp ⁵⁶	Phe ⁵⁸		5,80	
Arg ²⁴⁹	N ^{η2}	Asp ²⁰¹	O ^{δ2}	3,41	Trp ⁵⁶	Tyr ¹²¹		6,51	
Arg ²⁷⁰	N ^ε	Asp ¹⁸⁸	O ^{δ1}	2,81	Phe ⁵⁸	Tyr ¹²¹		5,84	
Arg ²⁷⁰	N ^{η2}	Asp ¹⁸⁸	O ^{δ2}	2,78	Tyr ¹⁹⁶	Tyr ²⁶⁵		5,46	
Arg ²⁷⁰	N ^{η1}	Asp ²⁵⁷	O ^{δ1}	2,76	Tyr ²⁶⁵	Trp ²⁶⁶		6,33	
Lys ²⁷⁵	N ^ε	Asp ²⁵⁷	O ^{δ2}	2,52					
CBT					CBT				
Lys ¹³⁶	N ^ε	Asp ¹⁴⁰	O ^{δ1}	2,99	Tyr ⁹¹	Trp ¹¹³		7,33	
Lys ¹⁴¹	N ^ε	Glu ¹¹²	O ^{ε2}	3,02	Tyr ¹⁶⁷	Tyr ¹⁷¹		5,28	
Arg ²⁴⁷	N ^{η2}	Asp ¹⁹⁷	O ^{δ2}	3,24	Phe ²⁶¹	Tyr ²⁶²		5,18	

предположение. В термитазе обнаружено 11 пар заряженных групп, образующих 14 солевых мостиков (табл. 2). В них участвуют 16 остатков и оба конца полипептидной цепи. В субтилилизине BPN' обнаружены только 3 ионные пары между 6 остатками. В то же время общее число заряженных групп в этих белках (32 в термитазе и 29 в субтилилизине BPN') примерно одинаково.

Расстояния между взаимодействующими атомами не превышают 3,2 Å, за исключением ионной пары Asp²⁰¹...Arg²⁴⁹ в термитазе и соответствующей ей в субтилилизине BPN'. Удивительно, что это единственная инвариантная ионная пара, хотя 12 остатков с одинаковым зарядом (Lys/Arg и Asp/Glu) сохраняют свои положения в структуре. Один из этих консервативных остатков — Asp³⁸ каталитической триады. Asp⁴⁷ в термитазе и соответствующий остаток в субтилилизине BPN', а также Asp⁶² и Arg¹⁰² в термитазе участвуют в связывании Ca²⁺. Все остальные консервативные заряженные группы в обоих белках не образуют ионных пар. Это наводит на мысль, что ионные пары не играют ключевой роли в формировании третичной структуры. В то же время значительная разница в их количестве в обоих ферментах показывает, что их вклад в стабилизацию структуры может быть существенным.

Гидрофобные взаимодействия. Из всех гидрофобных взаимодействий особо отмечалась стабилизирующая роль взаимодействий между взаимно перпендикулярными ароматическими кольцами [28]. В табл. 3 представлены такие взаимодействия между Phe, Tyr и Trp в термитазе и субтилилизине BPN'. Учитывались только пары остатков с расстояниями между центрами колец менее 8 Å.

В термитазе обнаружено 5 кластеров ароматических остатков, расположенных на поверхности молекулы или близко к ней. Один кластер содержит 4 остатка, другие — по 3. В этих взаимодействиях участвуют 16 остатков, что составляет две трети от общего числа ароматических остатков в ферменте. В субтилилизине BPN' только 6 остатков из 18 образуют взаимодействующие пары. Значительно большее количество гидрофобных взаимодействий в термитазе (13) по сравнению с субтилизином BPN' (3)

указывает на еще один возможный источник стабилизации третичной структуры.

Сравнение кристаллических структур термитазы и субтилизина BPN' выявило, таким образом, три возможных источника повышенной стабильности термитазы. Главным стабилизирующим фактором, на наш взгляд, являются ионы Ca^{2+} , связанные с молекулой фермента. Этот вывод соответствует экспериментальным данным, полученным на растворах субтилизинов [25]. Существенный вклад в стабилизацию фермента могут вносить также ионные и гидрофобные взаимодействия.

Пространственная структура термитазы, уточненная при высоком разрешении, позволяет предположить способы повышения стабильности субтилизинов путем направленного мутагенеза.

Экспериментальная часть

Термитаза выделена из *Thermoactinomyces vulgaris* и очищена как описано в работе [1]. Кристаллы нативной термитазы получены методом диффузии в парах из 0,5% раствора белка в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,6, в присутствии 2—4% 2-метил-2,4-пентандиола и 20—25% сульфата аммония. Кристаллы в виде тонких пластинок с размерами $0,8 \times 0,4 \times 0,1$ мм принадлежат к ромбической пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами ячейки: $a = 72,95$, $b = 64,05$, $c = 47,55$ Å. В асимметричной части ячейки содержится одна молекула фермента. Кристаллы Hg-производного термитазы получены настаиванием нативных кристаллов в 0,1 mM растворе HgCl_2 в течение 5 сут.

Полный набор дифракционных отражений при разрешении 1,4 Å измерен с одного кристалла на синхротронном излучении с длиной волны 0,8 Å. Эквивалентные отражения усреднены с R -фактором ($\Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma I$) 11,0%. Набор содержит 42 063 независимых отражения в зоне разрешения 5,0—1,4 Å, что составляет 99% теоретического количества.

Структура термитазы определена объединенным методом молекулярного и изоморфного замещения как описано в работе [16]. При этом использована неуточненная атомная модель субтилизина BPN' [17]. Ориентация молекулы термитазы в кристаллической ячейке определена с помощью функции вращения [29]. Ориентированную модель разместили в ячейке в предположении, что ион Hg^{2+} в изоморфном производном фермента ковалентно связан с SH-группой единственного остатка цистеина. Положение Hg^{2+} в ячейке было определено с помощью функции Паттерсона.

Кристаллографическое уточнение исходной модели как твердого тела по программе CORELS [30] снизило значение R -фактора ($\Sigma |F_o - F_c| / \Sigma F_o$) до 0,484 в интервале 6,0—4,0 Å. Затем по разностным картам электронной плотности модель была перестроена в соответствии с аминокислотной последовательностью. Циклы автоматического уточнения по программам CORELS и PROLSQ [31] чередовались с ручными исправлениями модели с использованием компьютерной графики. Постепенно подключались новые дифракционные данные. В результате после 316 циклов кристаллографическое уточнение было закончено с R -фактором 0,149 для 37446 отражений с $F > 3\sigma$ в интервале 5,0—1,4 Å.

Авторы выражают благодарность А. Н. Попову (Институт кристаллографии АН СССР) и З. Даутеру (EMBL, Гамбург) за помощь в проведении дифракционного эксперимента, Б. В. Строкопытову (Институт кристаллографии АН СССР) и К. Вильсону (EMBL, Гамбург) за помощь при уточнении структуры. Авторы признательны Федерации европейских биохимических сообществ за финансовую поддержку проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frömmel C., Hausdorf G., Höhne W. E., Behnke U., Ruttloff H. // Acta Biol. Med. Germ. 1978. V. 37. P. 1193—1204.
2. Meloun B., Baudys M., Kostka V., Hausdorf G., Frömmel C., Höhne W. E. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 2. P. 195—200.

3. Markland F. S., Smith E. L. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 8. P. 5198—5211.
4. Smith E. L., DeLange R. J., Evans W. H., Landon M., Markland F. S. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 4. P. 2184—2191.
5. Jany K. D., Mayer B. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1985. V. 366. P. 485—492.
6. Gaupher G. M., Stevenson K. J. // Methods Enzymol. 1976. V. 45. P. 414—433.
7. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 100. № 3. P. 1680—1687.
8. Честухина Г. Г., Эпремян А. С., Гайда А. В., Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1649—1658.
9. Kraut J. // Annu. Rev. Biochem. 1977. V. 46. № 1. P. 331—358.
10. James M. N. G., Stielecki A. R., Brayer G. D., Delbaere L. T. J., Bauer C. A. // J. Mol. Biol. 1980. V. 144. № 1. P. 43—88.
11. McPhalen C. A., Svendsen I., Jonassen I., James M. N. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 21. P. 7242—7246.
12. Bott R., Ultsch M., Kossiakoff A., Graycar T., Katz B., Power S. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 16. P. 7895—7906.
13. McPhalen C. A., Schnebli H. P., James M. N. G. // FEBS Lett. 1985. V. 188. № 1. P. 55—58.
14. Bode W., Paramokos E., Musil D. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 166. P. 673—692.
15. Betzel C., Bellemann M., Pal G. P., Saenger W., Wilson K. S. // Proteins: Structure, Function and Genetics. 1988. V. 4. P. 157—164.
16. Тепляков А. В., Строкопытов Б. В., Куранова И. П., Попов А. Н., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К., Фроммель К., Хене В. // Кристаллография. 1986. Т. 31. Вып. 5. С. 931—936.
17. Wright C. S., Alden R. A., Kraut J. // Nature. 1969. V. 221. № 5177. P. 235—242.
18. Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F., Brice M. D., Rogers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. № 3. P. 535—542.
19. Levitt M., Chothia C. // Nature. 1976. V. 261. № 5532. P. 552—557.
20. Venkatachalam C. M. // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 1425—1436.
21. Biochemistry. 1970. V. 9. № 9. P. 3471—3503.
22. Robertus J. D., Alden R. A., Birktoft J. J., Kraut J., Powers J. C., Wilcox P. E. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 6. P. 2439—2449.
23. Hirano S., Akagawa H., Mitsui I., Iitaka Y. // J. Mol. Biol. 1984. V. 178. № 2. P. 389—413.
24. Kretsinger R. H. // Annu. Rev. Biochem. 1976. V. 45. № 1. P. 239—266.
25. Frömmel C., Höhne W. E. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 670. № 1. P. 25—31.
26. Perutz M. F. // Science. 1978. V. 201. P. 1187—1191.
27. Walker J. E., Wonacott A. J., Haaris J. J. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. № 3. P. 581—586.
28. Burley S. K., Petsko G. A. // Science. 1985. V. 229. P. 23—28.
29. Crowther R. A. // The Molecular Replacement Method. V. 13 / Ed. Rossmann M. G. N. Y.: Gordon and Breach, 1972. P. 173—178.
30. Sussman J. L., Holbrook S. R., Church G. M., Kim S. // Acta Crystallogr. 1977. V. A33. № 5. P. 800—804.
31. Hendrickson W. A., Konnert J. H. // Biomolecular Structure, Conformation, Function and Evolution. V. 1 / Ed. Srinivasan R. Oxford: Pergamon Press, 1981. P. 43—57.

Поступила в редакцию
22.IV.1989

A. V. TEPHYAKOV, I. P. KURANOVA, E. G. HARUTYUNYAN, C. FRÖMMEL*, W. E. HÖHNE*

CRYSTAL STRUCTURE OF THERMITASE AND STABILITY OF SUBTILISINS

Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow:

* *Institute for Biochemistry, Humboldt University, Berlin*

Crystal structure of thermitase, a serine proteinase from *Thermoactinomyces vulgaris*, has been determined by X-ray diffraction at 1,4 Å resolution. The atomic model of thermitase refined to an *R*-factor of 0,149 contains 1997 protein atoms, 182 water molecules and 2 Ca²⁺ ions. The tertiary structure of thermitase is similar to that of subtilisin BPN'. The greatest variations are connected with insertions and deletions in the amino acid sequence, which are located on the surface of the molecule. Higher thermostability of thermitase can be explained in terms of the three-dimensional structure. The Ca²⁺ ions, bound to the protein molecule, as well as the ionic and hydrophobic interactions are supposed to give the main contribution to the stabilization of the structure.