



УДК 577.152.34.01:577.152.361.01:577.112

© 1994 Т. В. Ротанова,
С. А. Котова, А. Ю. Америк, И. П. Лыков,
Л. М. Гинодман, В. К. Антонов

АТФ-ЗАВИСИМАЯ ПРОТЕИНАЗА La ИЗ *Escherichia coli*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: протеиназа сериновая, АТРаза, выделение, структура, фрагментация, каталитически активный остаток Ser, ген *lon*, мутация.

Выделены гомогенные препараты АТФ-зависимой La-протеиназы *Escherichia coli* и двух ее мутантных форм, содержащих аланин вместо остатков Ser⁶⁷⁹ или Ser³⁶⁸. Получены данные, подтверждающие участие остатка серина в катализе. Показано, что каталитически активен остаток Ser⁶⁷⁹, а не остаток Ser³⁶⁸, активность которого была постулирована в литературе. С целью выбора одной из альтернативных структур гена *lon* изучено строение фрагментов La-протеиназы в области «спорных» участков. Подтверждена структура гена, установленная в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ. Отсутствие гидролиза ряда потенциальных белковых субстратов La-протеиназой в системе *in vitro* позволило выдвинуть гипотезу, согласно которой фермент в клетках *E. coli* функционирует не автономно, и для проявления его активности необходимы дополнительные факторы.

В последнее время большое внимание исследователей привлекает протеолиз, сопряженный с гидролизом АТФ, широко распространенный в живой природе [1—3]. Установлено, в частности, что в *E. coli* внутриклеточный гидролиз чужеродных, короткоживущих и мутантных белков контролируется в основном АТФ-зависимой протеиназой — так называемой La-протеиназой, ферментом, который относится к группе сериновых гидролаз [1, 2, 4, 5].

Исследование АТФ-зависимой La-протеиназы *E. coli* в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ было начато в 1988 г. Интерес к этому ферменту на первом этапе работы был обусловлен практическими задачами: представлялось весьма конструктивным на основании данных о свойствах фермента найти пути торможения его активности, а следовательно, и внутриклеточного протеолиза рекомбинантных белков в *E. coli*. Однако при более обстоятельном знакомстве с проблемой стало ясно, что изучение АТФ-зависимого протеолиза представляет самостоятельный интерес. Ферменты, подобные La-протеиназе, были обнаружены как в прокариотических (*Pseudomonas putida*) [6], так и в эукариотических (митохондрии печени крысы) [7] клетках. В последнее время при анализе библиотеки кДНК из мозга человека был идентифицирован клон, содержащий фрагмент кДНК, высокоомологичный гену *lon*, кодирующему La-протеиназу *E. coli* [8]. В настоящее время формируется концепция, согласно которой АТФ-зависимый протеолиз — это ранее не выявленная форма регуляции

1	<u>MNPERSERIE</u>	<u>IPVPLRDVV</u>	VYPHVIPLF	VGREKSIRCL	EAAMDHDKKI	50
51	MLVAQKEAST	DEPGVNDLFT	VGTVASILQM	LKLPDGTVKV	LVEGLQRARI	100
101	SALSDNGEHF	SAKAETLESP	TIDEREQEV	VRTAISQFEG	YIKLNKKIPP	150
151	EVLTSLSNSID	DPARLADTIA	AHMPKLADL	QSVLEMSDVN	ERLEYLMAMM	200
201	ESEIDLLQVE	²²⁰ KAIRNRVKKQ	<u>MEKSQKEYYL</u>	²⁴⁰ NEQMKAIQKE	<u>LGEMDDAPDE</u>	250
251	NEALKRKIDA	AKPKPEAKEK	AEAELQKLKM	MSPMSAEATV	<u>VRGYIDW</u> ²⁹⁷ <u>VMVQ</u>	300
		*RKRQKRK	RTGVAAEEND	VSDVGRSDRS	AWLYRLDGTG	
301	<u>VP</u> ³⁰³ <u>WNARSKVK</u>	KDLRQAQEIL	DTDHYGLERV	KDRILEYLAV	²⁹² QSRVNIKIGP	350
	AVECAYEGQK	RPASGA-*				
351	<u>ILCLVGGPPGV</u>	<u>GKTSLGG</u> ³⁶⁸ <u>SIA</u>	KATGRKYVRM	ALGGVRDEAE	IRGHRRTYIG	400
401	SMPGKLIQKM	AKVGVKNPLF	LLDEIDKNSS	DMRGDPASAL	LEVLDPEQNV	450
451	AFSDHYLEV	YDLSDFVFA	TSNSMNIPAP	LLDRMEVIRL	SGYTEDEKLN	500
501	IAKRHLLPKQ	IERNALKKGE	LTVDDSAIIG	IIRYYTREAG	VRGLEREISK	550
				*RA	CVVWSVKSPN	
551	LCRKAVKQLL	LDKSLKHIEI	NGDNLHDYLG	VQRFDYGRAD	NENRVGQVTG	600
	CVAKRLSSYC	SIT*				
601	<u>LAW</u> ⁶⁰³ <u>TEVGGDL</u>	LTLETACVPG	KGKLYTGS	GEVMQESIQA	ALTVVRARAE	650
651	KLGINPDFYE	KRDIHVHVE	GATPKDGP	⁶⁷⁹ SA	GIAMCTALVS	700
701	VAMTGEITLR	GQVLPIGGLK	EKLLAAHRGG	IKTVLIPFEN	KRDLEEIPDN	750
751	VIADLDIHPV	KRIEEVTLA	LQNEPSGMRV	VTAK		

Рис. 1. Аминокислотная последовательность La-протеиназы, выведенная по структуре гена *lon* [10]. (Второй строкой, ограниченной звездочками, приведены альтернативные участки структуры, выведенной А. Гольдбергом [11]; подчеркнуты фрагменты, структура которых определена секвенированием; пунктиром подчеркнут консервативный АТФ-связывающий участок)

протеолитической активности, сопряженная с энергетическим статусом клетки. Исследование АТФ-зависимого протеолиза становится одним из наиболее перспективных и актуальных направлений в химии протеолиза.

В нашей лаборатории был клонирован ген *lon*, определена его структура и на основании полученных данных выведена аминокислотная последовательность La-протеиназы (рис. 1) [9, 10]. Практически одновременно структура гена *lon* была определена в лаборатории проф. А. Гольдберга (США) [11]. При сравнении структур обнаружили различия в двух участках нуклеотидной последовательности (1208—1369 и 2033—2107) и соответствующие различия выведенных аминокислотных последовательностей в области остатков 264—317 и 539—563 (рис. 1).

Конкретные задачи дальнейшего исследования La-протеиназы *E. coli* были следующими: 1) выделение La-протеиназы и доказательство индивидуальности белка; 2) определение структуры фермента в области, кодируемой «спорными» участками нуклеотидной последовательности генов *lon*; 3) характеристика физико-химических и энзимологических свойств La-протеиназы; 4) подтверждение участия серина в катализе, осуществляемом La-протеиназой, и локализация остатка серина, входящего в активный центр фермента.

*Выделение гомогенного препарата La-протеиназы
из клеток штамма E. coli AB 1899/pBR327lon*

На первых этапах работы по выделению La-протеиназы в качестве источника фермента был использован дикий штамм *E. coli*, однако выяснилось, что содержание фермента в клетках не превышает 0,01% (от общего клеточного белка). Для увеличения выхода фермента был создан высокопродуктивный штамм, в котором уровень экспрессии La-протеиназы повысился примерно до 0,7%. С этой целью в дефектный по гену *lon* штамм *E. coli* AB 1899 была введена рекомбинантная многокопийная плазида pBR327, несущая ген *lon* с собственными регуляторными элементами [10].

Мы учитывали, что создание высокопродуктивного штамма может привести к осложнениям, связанным с тем, что значительное увеличение внутриклеточного содержания La-протеиназы токсично для клеток, приводит к резкому возрастанию протеолиза белков и автолизу клеток, в результате снижается количество биомассы. Однако это препятствие удалось преодолеть, учтя тот факт, что La-протеиназа относится к белкам теплового шока. Клетки штамма AB 1899/pBRlon выращивали сначала при пониженной относительно оптимума температуре (30° C) до $A_{600} = 0,8-1,0$, а затем для индукции синтеза La-протеиназы их подвергали тепловому шоку при 42° C в течение 1 ч. В этом варианте ферментации (в колбах) из 1 л культуральной жидкости получали 1,5—2,0 г клеток, которые использовали для выделения La-протеиназы.

При проведении крупномасштабной ферментации штамма-суперпродуцента La-протеиназы технология процесса была оптимизирована: питательная среда обогащена минеральными солями и глюкозой, осуществлялась постоянная интенсивная аэрация; это привело к увеличению скорости роста клеток более чем в 10 раз. При проведении процесса в 100-л ферментере получали 20 г клеток на 1 л культуральной среды. Клетки могли храниться при —70° C в течение нескольких месяцев.

Фермент выделяли по следующей схеме: отмытые клетки обрабатывали лизоцимом и подвергали действию ультразвука. Для отделения обломков клеточных стенок и мембран суспензию центрифугировали 1 ч при 100 000g. Полученный бесклеточный экстракт хроматографировали последовательно на фосфоцеллюлозе P-11 и на DEAE-ToyoPearl.

В качестве субстрата для тестирования активности La-протеиназы использовали радиоактивный [¹⁴C]ацетил- α -казеин, синтезированный по модифицированной методике [12]. Под гидролизом казеина понимается расщепление его до пептидов, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой. За активность La-протеиназы принимали разность степени гидролиза субстрата в отсутствие и в присутствии АТР (трис-НCl-буфер, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, ± 3 мМ АТР, 37° C, 0,06 мг/мл [¹⁴C]ацетил- α -казеин, радиоактивность 15 мКи/ммоль) [10]. Следует отметить, что на начальных этапах выделения фермента (гомогенат клеток *E. coli*, бесклеточный экстракт) определить АТР-зависимую протеолитическую активность не представлялось возможным из-за экранирующего действия внутриклеточных АТР-независимых протеиназ, обладающих высокой активностью.

Хроматографию La-протеиназы на фосфоцеллюлозе проводили в К-фосфатном буфере, рН 6,8 (сорбция из 0,1 М буфера, элюция 0,5 М буфером). Так как La-протеиназа проявляет свойства ДНК-связывающего белка, фосфоцеллюлоза

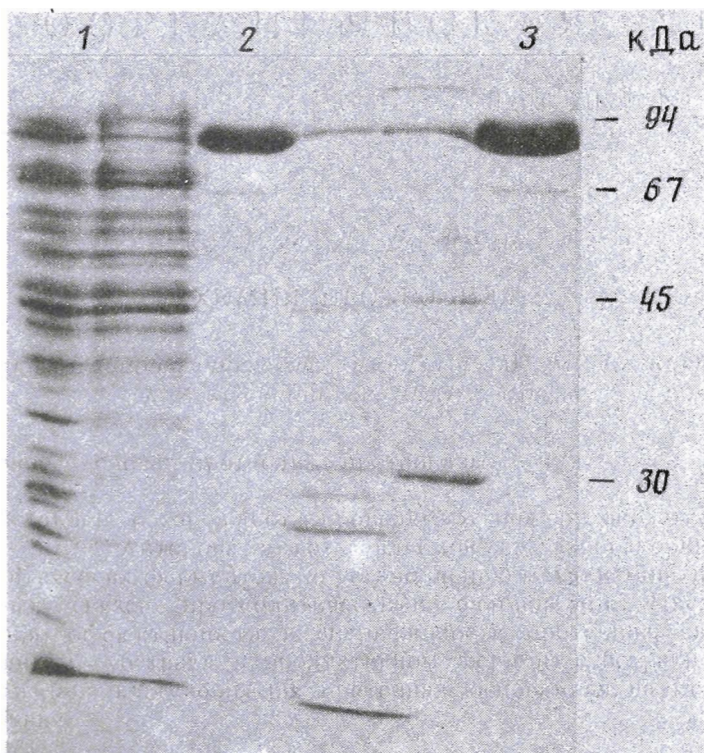


Рис. 2. Гель-электрофорез в присутствии SDS препаратов La-протеиназы на разных стадиях очистки: бесклеточный экстракт (1) и препараты после хроматографии на фосфоцеллюлозе (2) и на DEAE-ToyoPearl (3)

выступает по отношению к ней не только как ионообменник, но и как аффинный сорбент. По-видимому, благодаря этому при хроматографии на фосфоцеллюлозе удается в значительной степени освободиться от балластных белков. Чистота фермента, по данным электрофоретического анализа (рис. 2), примерно 85%.

При дальнейшей очистке La-протеиназы фракции, содержащие АТФ-зависимую протеолитическую активность, диализовали против 0,1 М трис-НСI-буфера (рН 7,5) и хроматографировали на DEAE-ToyoPearl. Элюцию La-протеиназы проводили в условиях линейного градиента концентрации хлорида натрия (0—0,5 М) в том же буфере. Активность обнаруживалась в белковом пике, выходящем при концентрации NaCl 0,25—0,3 М. Полученный препарат фермента был практически гомогенным по данным SDS-электрофореза (рис. 2). На этой стадии выход La-протеиназы составил 125 мг из 100 г биомассы клеток (табл. 1), активность препарата составляла 170 мкг субстрата/мг фермента·ч. Следует подчеркнуть, что фермент не проявлял протеолитической активности в отсутствие АТФ. В то же время очищенная La-протеиназа обладает способностью гидролизовать АТФ в отсутствие белкового субстрата, добавление последнего повышает АТФазную активность.

Гомогенность выделенного препарата La-протеиназы была подтверждена анализом N-концевой последовательности фермента. Для этого был использован препарат La-протеиназы, подвергнутый гель-электрофорезу и перенесенный электроблоттингом на PVDF-мембрану. Полученная структура N-концевого участка выделенного фермента Met-Asn-Pro-Glu-Arg-Ser-Glu-Arg-Ile-Glu-Ile-Pro-Val-Leu-Pro полностью соответствует последовательности 15 N-концевых аминокислот в структуре La-протеиназы, представленной на рис. 1.

Выделение La-протеиназы из клеток *E. coli* AB1899/pBR327lon
(из 100 г сырых клеток)

Стадия	Белок, мг	Выход, %
Бесклеточный экстракт	3850	100
Хроматография на фосфоцеллюлозе	510	13,2
Хроматография на DEAE-ToyoPearl	125	3,2*

* Протеолитическая активность (мкг субстрата/мг Е·ч) без АТФ — 0, в присутствии АТФ — 170.

Определение структуры La-протеиназы в области, кодируемой «спорными» участками нуклеотидной последовательности гена lon

Как отмечалось выше, было предложено два частично различающихся варианта структуры гена *lon* и соответственно два варианта аминокислотной последовательности La-протеиназы: (I) [10] и (II) [11]. Для выяснения, какому варианту гена соответствует строение выделенной нами La-протеиназы, необходимо было провести фрагментацию белковой молекулы таким образом, чтобы образовавшиеся при этом пептиды содержали «спорные» участки аминокислотной последовательности. Сначала было проведено несколько экспериментов по ферментативному расщеплению La-протеиназы. В оптимальном варианте ожидали получения небольшого числа крупных, легко разделяющихся фрагментов, N-концевая часть которых находилась бы в «спорной» области. Обработка La-протеиназы трипсином и пепсином приводила к глубокому гидролизу белковой молекулы (данные не показаны). Действием дуоденазы (фермента с трипсиноподобной специфичностью, выделенного в нашей лаборатории из двенадцатиперстной кишки быка [13]) был получен гидролизат, содержащий ряд фрагментов с молекулярной массой от 20 до 60 кДа, которые были перенесены электроблоттингом на PVDF-мембрану и анализированы N-концевым секвенированием. При этом однозначные результаты были получены только для двух фрагментов с молекулярной массой около 60 кДа. Сравнение полученных последовательностей аминокислот (Gln-Met-Glu-Lys-Ser- и Glu-Leu-Gly-Glu-) с последовательностью La-протеиназы (рис. 1) позволило локализовать места расщепления фермента по пептидным связям Lys²¹⁹—Gln²²⁰ и Lys²³⁹—Glu²⁴⁰. Области, включающие эти связи, оказались вне «спорных» участков аминокислотной последовательности La-протеиназы. Таким образом, полученные результаты можно рассматривать только как подтверждение структуры La-протеиназы. Следовательно, необходимо было использовать другой метод фрагментации.

Была проведена химическая фрагментация молекулы фермента по остаткам триптофана с помощью BNPS-скатола [14]. Такой тип фрагментации представлялся целесообразным, так как в обоих вариантах структуры фермента имеется по три остатка триптофана, причем два остатка каждой из структур локализованы в пептидных фрагментах, относящихся к «спорным» участкам последовательности,— это Trp²⁹⁷ и Trp³⁰³ в структуре (I) и Trp²⁹² и Trp⁵⁴⁴ в структуре (II), окружение этих остатков в структурах (I) и (II) различно (рис. 1). Третий остаток триптофана не попадает в «спорные» участки и занимает положение 603 в обеих структурах (рис. 1). Расщепление белка по остаткам триптофана должно было привести к образованию ограниченного числа пептидов; при этом как от структуры (I), так и от структуры (II) можно было ожидать образования пептидов с молекулярной массой около 50 кДа и с N-концевыми фрагментами, попадающими в «спорные» участки последовательности. Действительно, при гель-электрофорезе реакционной смеси была выявлена полоса с ожидаемой молекулярной массой.

Анализ результатов секвенирования 50-кДа фрагментов La-протеиназы в сопоставлении с данными по структуре соответствующих участков последовательностей (I) и (II), выведенных по генам *lon*

Аминокислоты	Этапы секвенирования				
	1	2	3	4	5
Идентифицированные	Asn Met	Ala Val	Gln (Pro)	Ser Val	— Pro
Предсказанные (по структуре (I))	Met ²⁹⁸ Asn ³⁰⁴	Val Ala	Gln Arg	Val Ser	Pro Lys
Предсказанные (по структуре (II))	Leu ²⁹³	Tyr	Arg	Leu	Asp

Как выяснилось при дальнейшем исследовании, эта полоса включала в себя два неразделенных полипептида. В результате электроблоттинга и секвенирования N-концевой последовательности (без разделения полипептидов) обнаружены аминокислотные остатки, приведенные в табл. 2.

N-Концевые последовательности выделенных электроблоттингом полипептидов соответствуют структуре участков 298—302 и 304—307 последовательности (I) La-протеиназы и не содержат остатков, принадлежащих участку 293—297 альтернативной последовательности (II).

Полученные результаты позволяют однозначно решить вопрос о «спорных» участках в структуре гена *lon* и сделать выбор в пользу структуры, установленной ранее нами [10].

Физико-химические и энзимологические свойства La-протеиназы

По данным гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 2) молекулярная масса La-протеиназы составляет 87 кДа, что хорошо согласуется с величиной, рассчитанной по структуре белка (рис. 1) [10]. Эксклюзионная хроматография фермента в неденатурирующих условиях на различных носителях (Sephacryl S-400, Bio Gel A-5m, TSK Gel HW 65 — гель-фильтрация, TSK G 4000 — HPLG, Superose 6 — FPLC) показала, что белок в растворе существует в виде олигомеров с молекулярной массой от 350 до 1000—2000 кДа. С полученными результатами согласуются данные электронной микроскопии: показано, что в растворе La-протеиназы имеется широкий спектр белковых частиц, содержащих до 10 субъединиц (исследование проведено совместно с сотрудниками Института кристаллографии РАН). Установлено, что АТФ-зависимой протеолитической активностью обладают только фракции с молекулярной массой около 400 кДа (тетрамер).

По данным изоэлектрофокусирования, изоэлектрическая точка (pI) La-протеиназы равна 6,0. С полученным результатом совпадает вычисленное по аминокислотному составу значение для изоточки фермента [10].

При изучении La-протеиназы методом спектроскопии КД (рис. 3, исследование проведено совместно с сотрудниками лаборатории спектрального анализа ИБХ) показано, что содержание α -спиральных структур в молекуле фермента весьма велико (около 50%). С этим наблюдением согласуется теоретически рассчитанный по аминокислотной последовательности тип вторичной структуры фермента — α/β (с чередованием α -спиральных и β -складчатых структур) [10].

Чтобы охарактеризовать каталитическую активность и субстратную специфичность La-протеиназы, было исследовано действие ее на ряд потенциальных субстратов. При выборе субстрата принималось во внимание, что, согласно

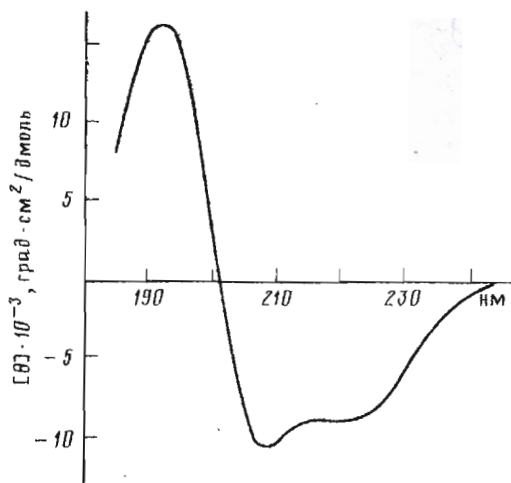


Рис. 3. Спектр КД раствора La-протеиназы в 50 мМ трис-НСI-буфере, рН 7,5, при с 0,4 мг/мл, l 0,05 см

литературным данным, La-протеиназа *in vivo* вовлечена в процесс гидролиза либо чужеродных для клетки, либо мутантных, либо собственных, но модифицированных белков. В пользу этого свидетельствуют известные из литературы данные: 1) в клетках *E. coli* с увеличенным содержанием La-протеиназы (например, штаммы, содержащие многокопийную плазмиду с клонированным геном *lon*) в несколько раз возрастает скорость деградации белков, содержащих аналоги незаменимых аминокислот [15], или образующихся в результате теплового шока [16], а также «укороченных» белков, так называемых «пурамициновых фрагментов» [15], получающихся в результате введения в питательную среду антибиотика пурамицина; 2) экспрессируемые в интактных клетках *E. coli* рекомбинантные белки часто подвергаются быстрой протеолитической деградации [17], о чем свидетельствует значительно более высокий уровень их продукции в клетках, мутантных по гену *lon*. Поэтому было естественно исследовать в качестве субстратов La-протеиназы собственные денатурированные белки *E. coli* (ДНКаза, β-галактозидаза и щелочная фосфатаза) и белки других организмов: BSA (нативный и денатурированный), [¹⁴C]ацетил-BSA, [¹⁴C]ацетил-α-казеин, пепсин, глобин, проинсулин, инсулин, глюкагон. Отдельную группу потенциальных субстратов La-протеиназы составили рекомбинантные белки, полученные на основе β-галактозидазы (G): G-энкефалин, G-вазоактивный кишечный пептид и G-антигенная детерминанта энтеротоксина А (из *Staphylococcus aureus*).

Потенциальный субстрат инкубировали с La-протеиназой (трис-НСI-буфер, рН 7,5, 3 мМ АТФ, 10–20 мМ MgCl₂; контроль без АТФ). Анализ реакционной смеси проводили с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях (с SDS или в 6 М мочеvine), гель-фильтрации и ВЭЖХ. Неожиданным оказалось то, что большинство из исследованных белков не подвергается гидролизу La-протеиназой в условиях *in vitro*. Продукты деградации обнаружены только при использовании в качестве субстратов [¹⁴C]ацетил-α-казеина и глюкагона (незначительное расщепление наблюдается также для глобина). Даже антигенная детерминанта энтеротоксина А, которая при экспрессии в клетках *E. coli* 1899 подвергается быстрой деградации [18], в системе *in vitro* не гидролизуется La-протеиназой. Совокупность полученных данных позволяла полагать, что *in vivo* La-протеиназа функционирует в комплексе с рядом факторов, возможно и белковой природы. Действительно, в последнее время появились данные о том, что в процессе деградации измененных и чужеродных белков в клетках *E. coli* участву-

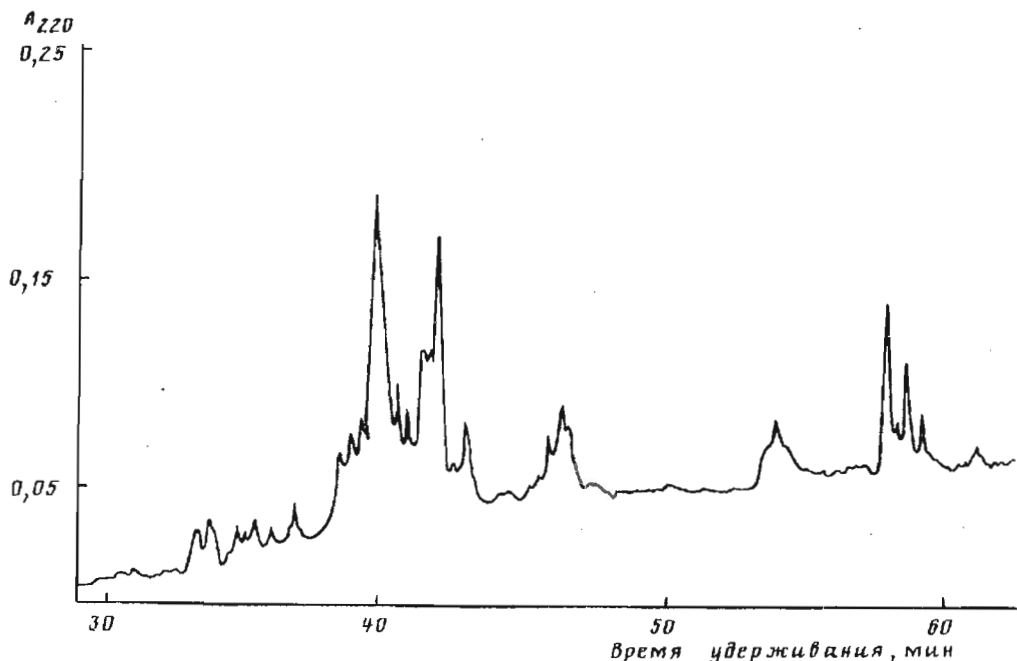


Рис. 4. офВЭЖХ продуктов гидролиза [^{14}C]ацетил- α -казеина на колонке (4 \times 250 мм) Separon RPS (C18) в 0,05% TFA. Градиент концентрации ацетонитрила 0—80% за 60 мин, скорость 1 мл/мин. Условия реакции гидролиза: 25 мкг субстрата и 20—25 мкг La-протеиназы инкубировали 60 мин при 37° С в трис-НСl-буфере (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ. Объем образца 100 мкл

ют белки теплового шока — «шапероны», которые обеспечивают узнавание и гидролиз La-протеиназой ее субстратов [2, 19].

В качестве модельного белкового субстрата для изучения энзиматических свойств La-протеиназы был использован [^{14}C]ацетил- α -казеин. Эффективность гидролиза оценивали по содержанию радиоактивно меченных продуктов, растворимых в трихлоруксусной кислоте. Показано, что в отсутствие АТФ и ионов магния субстрат не подвергается действию фермента. Найдены оптимальные концентрации эффекторов: АТФ — 2—3 мМ и MgCl₂ — 10—20 мМ. Определена рН-зависимость активности La-протеиназы и показано, что оптимум находится при рН около 9,0.

Расщепление [^{14}C]ацетил- α -казеина La-протеиназой осуществляется по многим связям одновременно, причем скорость образования всех фрагментов примерно одинакова. Хроматография продуктов гидролиза с помощью ВЭЖХ (рис. 4) показала, что число мест расщепления больше 10, однако эти данные не позволили сделать вывод о специфичности фермента по отношению к гидролизующим связям, поскольку каждый из пиков на хроматограмме представлял собой не индивидуальный пептид, а смесь нескольких компонентов. Рехроматография фрагментов субстрата из отдельных пиков также не привела к получению индивидуальных пептидов.

Данные о природе связей, гидролизующихся La-протеиназой, были получены в опытах по расщеплению глюкагона (трис-НСl-буфер, рН 7,5, 37° С, 4 мМ АТФ, 20 мМ MgCl₂; в отсутствие АТФ гидролиз не наблюдался). Продукты гидролиза разделяли методом ВЭЖХ в обращенной фазе (рис. 5). Фракции, соответствующие пикам на хроматограмме, были собраны и идентифицированы методом дансирования N-концевой аминокислоты и количественным аминокислотным анализом. Установлено, что все они (за исключением пиков 2, 3 и 5) — индивидуальные пептиды.

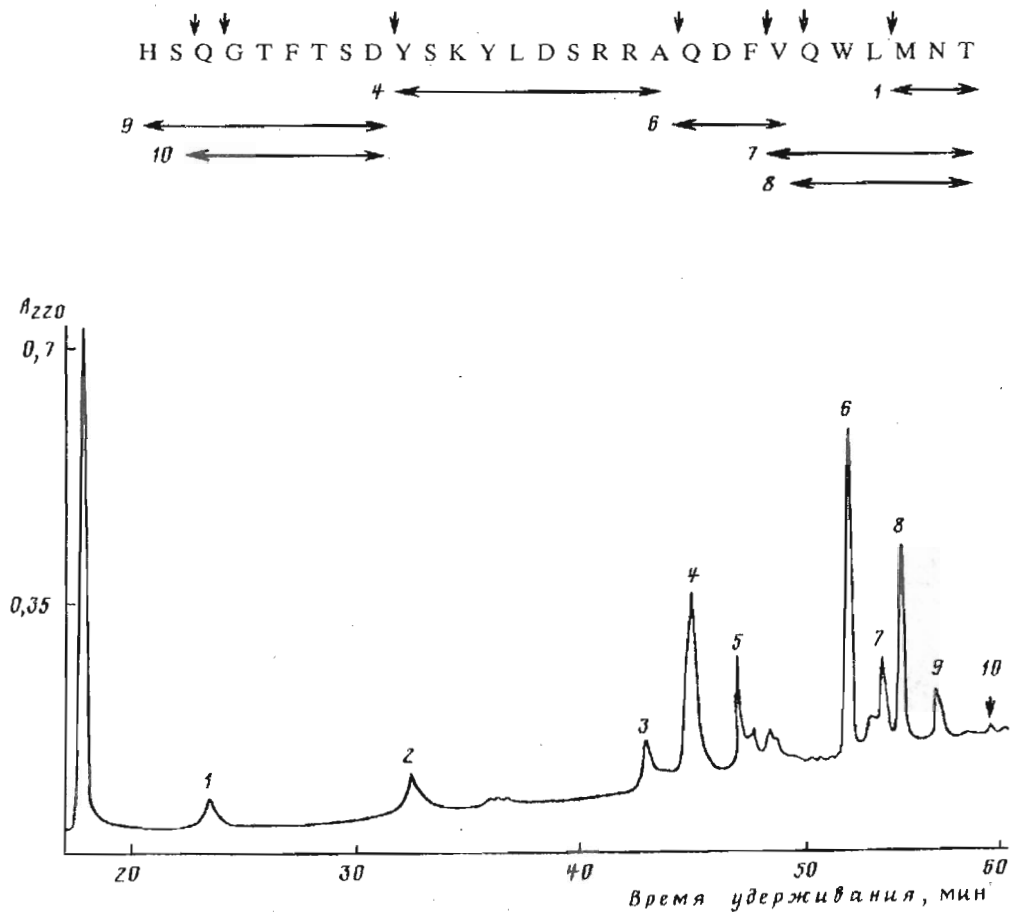


Рис. 5. оФВЭЖХ продуктов гидролиза глюкагона на колонке (4×250 мм) Separon RPS (C18) в 0,05% TFA. Градиент концентрации ацетонитрила 0—100% за 60 мин, скорость 1 мл/мин. Условия гидролиза: 100 мкг глюкагона и 20 мкг La-протеиназы инкубировали 60 мин при 37° С в трис-HCl-буфере (pH 7,5), 20 mM MgCl₂, 4 mM АТФ. Объем образца 50 мкл

Анализ накопления продуктов гидролиза глюкагона во времени показал, что большинство фрагментов образуется на первом этапе реакции. Некоторые пептиды (пики 1, 4 и 6) стабильны во времени и не подвергаются вторичному расщеплению, другие (пики 7, 9 и 10) являются промежуточными продуктами деградации глюкагона и гидролизуются далее до более мелких фрагментов.

Гидролизуемые La-протеиназой в глюкагоне связи показаны на рис. 5. Видно, что гидролизуются преимущественно связи, соответствующие специфичности химотрипсина, т. е. связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных (Phe, Leu, Ala, Val) аминокислот. Следует отметить, однако, что на первом этапе гидролиза остаются интактными связи, образованные остатками Phe⁶, Tyr¹⁰, Tyr¹³ и Leu¹⁴, и расщепляется связь, образованная дикарбоновой аминокислотой — остатком Asp⁹. Приведенные результаты не позволяют отнести La-протеиназу к какой-либо из известных подгрупп сериновых протеиназ. Дальнейшие исследования должны дать ответ на вопрос: имеет ли фермент широкую специфичность или он обладает своеобразной вторичной специфичностью?

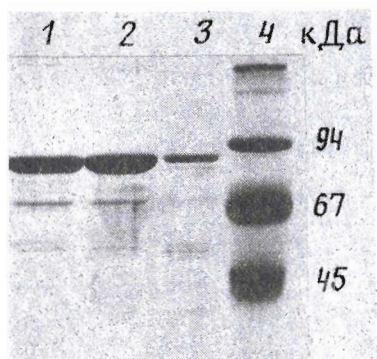


Рис. 6. Гель-электрофорез нативной La-протеиназы (3) и ее мутантных форм La-m679 (1) и La-m368 (2), 4 — белки-маркеры

К характеристике активного центра La-протеиназы Участие серина в катализе и локализация активного остатка

Известно, что концентрация диизопропилфторфосфата, при которой большинство сериновых протеиназ теряет активность, вызывает лишь частичную инактивацию La-протеиназы [20, 21]. До настоящего времени вопрос об участии серина в активном центре фермента не получил прямого подтверждения, тем более что особенностью структуры La-протеиназы является отсутствие характерных присущих известным подгруппам сериновых протеиназ (химотрипсин, эластаза, субтилизин) консервативных последовательностей, содержащих каталитически активные остатки серина, гистидина и аспарагиновой кислоты [22].

Анализ первичной последовательности La-протеиназы позволил сформулировать концепцию о «трехдоменном» строении фермента [10], согласно которой центральный домен молекулы (включающий консервативный АТР-связывающий участок Phe^{351} — Leu^{365} , рис. 1) является АТР-азой, а С-концевой — протеиназой; функциональная роль N-концевого домена до настоящего времени остается неясной. По этой концепции предполагаемый каталитически активный остаток серина должен быть расположен в С-концевой части молекулы; было высказано предположение, что это остаток Ser^{679} [10]. В то же время было постулировано [23], что активен другой остаток — Ser^{368} (центральный домен).

В нашей лаборатории были проведены точечные мутации гена *lon* [24], которые позволяли решить две задачи: 1) получить дополнительные данные, свидетельствующие об участии в катализе остатка серина; 2) локализовать этот остаток. Были осуществлены замены остатков Ser^{679} и Ser^{368} на аланин и сконструированы соответствующие рекомбинантные плазмиды pBR 327/*lon*-m679 и pBR 327/*lon*-m368, несущие мутантные гены. Введение плазмид в клетки штамма *E. coli* АВ 1899 позволило получить продуценты мутантных белков [24]. Исследование лизатов клеток методом гель-электрофореза показало, что внесенные замены не влияют на эффективность экспрессии белка La-протеиназы.

Экспрессируемые трансформированными клетками белки-мутанты, условно обозначенные La-m679 и La-m368, были выделены нами по той же схеме, что и нативная La-протеиназа. Учитывая, что при модификации активного серина фермент должен утрачивать активность, мутантные белки в процессе очистки обнаруживали с помощью антител к нативной La-протеиназе (реакция иммунопреципитации). Полученные белки по электрофоретическим характеристикам и физико-химическим свойствам не отличались от исходной La-протеиназы (рис. 6). Степень очистки мутантных белков, по данным гель-электрофореза, составила около 90%.

Сопоставление энзимологических характеристик La-протеиназы и ее мутантных форм

Препарат фермента	Протеолитическая активность *		АТРазная активность **
	—АТР	+АТР	
La-протеиназа	0	170	750
La-m679	0	0	1100
L-m368	0	125	670

* Выражена в мкг превращенного [^{14}C]ацетил- α -казеина в 1 ч на 1 мг фермента.

** Выражена в нмоль превращенного АТР в 1 ч на 1 мг фермента.

Сопоставление активности La-протеиназы и ее мутантов показало (табл. 3), что мутант La-m679, содержащий остаток аланина вместо Ser⁶⁷⁹, полностью утрачивает АТР-зависимую протеолитическую активность, в то время как у мутанта La-m368 наблюдается лишь незначительное снижение активности. Следует отметить, что АТРазная активность сохраняется у обеих мутантных форм фермента. При этом у мутанта La-m368 она остается практически неизменной, а у La-m679 даже несколько увеличивается. Полученные результаты убедительно показывают, что серин участвует в каталитическом процессе и что в состав активного центра входит остаток Ser⁶⁷⁹; одновременно подтверждается справедливость предположения о том, что именно С-концевая часть молекулы выполняет функции протеиназы.

В настоящее время в нашей лаборатории определена структура полноразмерной кДНК АТР-зависимой протеиназы из мозга человека. Сравнительный анализ первичных структур La-протеиназы и АТР-зависимой протеиназы из мозга позволил выявить высококонсервативные участки последовательностей, в которых, вероятно, локализованы каталитически активные аминокислотные остатки.

Суммируя вышеизложенное, можно констатировать, что La-протеиназа является представителем новой уникальной подгруппы сериновых протеиназ, которые характеризуются следующими свойствами: 1) АТР-зависимостью процесса протеолиза; 2) отсутствием в молекуле характерных для других подгрупп сериновых протеиназ консервативных структур, включающих триаду каталитически активных остатков; 3) отсутствием активности по отношению к большому количеству белковых субстратов в системе *in vitro* и нетипичной специфичностью при гидролизе пептидного субстрата.

Последнее обстоятельство позволило предположить, что функционирование La-протеиназы в клетках *E. coli* осуществляется в комплексе с некоторыми другими факторами, и это предположение в последнее время получило подтверждение в литературе.

Авторы приносят благодарность Л. Г. Чистяковой за предоставление штамма *E. coli* АВ 1899, И. В. Назимову, Г. А. Гришиной, Е. Н. Чертовой и Ю. Ф. Леоновой за сотрудничество в определении структуры пептидных фрагментов, Т. И. Костроминой за помощь в разработке условий крупномасштабной ферментации штамма-продуцента La-протеиназы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldberg A. L. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. № 1. P. 9—23.
2. Gottesman S., Maurizi M. R. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. № 4. P. 592—621.
3. Hershko A., Ciechanover A. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1986. V. 33. P. 19—56.
4. Gottesman S. // Annu. Rev. Genet. 1989. V. 23. P. 163—198.

5. Maurizi M. R. // *Experientia*. 1992. V. 48. P. 178—200.
6. Ротанова Т. В., Михайлов А. П., Чистякова Л. Г., Игнатов К. Б., Антонов В. К. // Всесоюз. симп. «Химия белка». Тез. докл. Тбилиси, 1990. С. 14.
7. Desautels M., Goldberg A. L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 1869—1873.
8. Adams M. D., Dubnick M., Kerivage A. R., Moreno R., Kelley J. M., Utterback T. R., Nagle J. W., Fields C., Venter J. C. // *Nature*. 1992. V. 355. P. 632—634.
9. Америк А. Ю., Чистякова Л. Г., Остроумова Н. И., Гуревич А. И., Антонов В. К. // *Биоорганическая химия*. 1988. Т. 14. № 3. С. 408—411.
10. Америк А. Ю., Антонов В. К., Остроумова Н. И., Ротанова Т. В., Чистякова Л. Г. // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. № 7. С. 869—880.
11. Chin T. D., Goff S. A., Webster T., Smith T., Goldberg A. L. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 24. P. 11718—11728.
12. Hatcher V. B., Wertheim M. S. // *Biochim. et biophys. acta*. V. 451. № 2. P. 499—510.
13. Воротынцева Т. И., Замолодчикова Т. С., Антонов В. К. // III Сямп. «Химия протеолитических ферментов». Тез. докл. и стенд. сообщ. М., 1993. С. 9.
14. Crimmins D. L., McCourt D. W., Thoma R. S. // *Anal. Biochem.* 1990. V. 187. № 1. P. 27—38.
15. Goff S. A., Goldberg A. L. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 10. P. 4508—4515.
16. Goff S. A., Casson L. P., Goldberg A. L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 6647—6651.
17. Hellebust H., Veide A., Enfors S. // *J. Biotechnol.* 1988. V. 7. P. 185—198.
18. Чистякова Л. Г. Исследование *lon*-гена *Escherichia coli* и продуктов его экспрессии: Дис. ... канд. биол. наук. М.: ВНИИ МДиЛ МЗ России, 1993.
19. Sherman M. Yu., Goldberg A. L. // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 1. P. 71—77.
20. Chung Ch. H., Goldberg A. L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. № 8. P. 4931—4935.
21. Waxman L., Goldberg A. L. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 22. P. 12022—12028.
22. Антонов В. К. *Химия протеолиза*. 2-е изд. М.: Наука, 1991. 504 с.
23. Baker M. E. // *FEBS Lett.* 1989. V. 244. № 1. P. 31—33.
24. Америк А. Ю., Антонов В. К., Горбаленя А. Е., Котова С. А., Ротанова Т. В., Шимбаревич Е. В. // *FEBS Lett.* 1991. V. 287. № 1, 2. P. 211—214.

Поступила в редакцию
16.VII.1993

T. V. Rotanova, S. A. Kotova, A. Yu. Amerik,
I. P. Lykov, L. M. Ginodman, V. K. Antonov

ATP-DEPENDENT PROTEINASE La FROM *Escherichia coli*

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Homogeneous preparations of the ATP-dependent La proteinase from *E. coli* and two its mutant forms, containing an alanine residue instead of Ser⁶⁷⁹ or Ser³⁶⁸, were isolated. Ser⁶⁷⁹ was shown to be catalytically active rather than Ser³⁶⁸ as suggested in the literature. To choose between the alternative structures of the gene *lon* La proteinase fragments within the controversial regions were analysed and the gene structure established at the Laboratory of Proteolytic Enzymes (Institute of Bioorganic Chemistry) was confirmed. Inactivity of La proteinase in some in vitro systems suggests its functioning in vivo to be not autonomous, requiring additional factors.