



УДК 577.152.34'13

© 1994 М. А. Белозерский, Я. Е. Дунаевский, Е. Н. Эллина

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ УЧАСТИЕ ПРОТЕИНАЗ В ГИДРОЛИЗЕ
ГЛАВНОГО ЗАПАСНОГО БЕЛКА СЕМЯН ГРЕЧИХИ*НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва*

Ключевые слова: гречиха, запасной белок, протеиназы, протеолиз, семена.

Изучалась система протеолитических ферментов, осуществляющих деградацию главного запасного белка семян гречихи, 13S-глобулина. Гидролиз этого белка в прорастающих семенах гречихи протекает в две выраженные стадии, как у большинства двудольных растений: 1) ограниченный протеолиз (модификация), осуществляемый металлопротеиназой, присутствующей в покоящихся семенах; 2) глубокий гидролиз модифицированного белка до небольших пептидов и аминокислот, осуществляемый цистеиновой протеиназой и карбоксипептидазой, синтезируемыми *de novo* при прорастании семян. На последних этапах в процессе расщепления белка участвует также аспартильная протеиназа. Все ферменты, принимающие участие в гидролизе 13S-глобулина, локализованы в белокзапасующих органеллах — белковых телах и вакуолях клеток семядолей семян гречихи.

Протеолиз запасных белков при прорастании семян — один из важнейших процессов в метаболизме растений, от которого в значительной степени зависит формирование проростка и в конечном итоге всего растения. В течение длительного времени этот процесс рассматривался в несколько упрощенном виде: считалось, что запасные белки просто гидролизуются в нужное время под действием протеиназ, либо присутствующих в покоящихся семенах, либо синтезируемых в процессе их прорастания. Однако, когда исследователи научились получать высокоочищенные препараты протеолитических ферментов из семян растений и стали изучать их действие на запасные белки, оказалось, что эти белки либо плохо расщеплялись протеиназами семян, либо вообще ими не гидролизывались. И только в работах последних 10—12 лет было четко установлено, что протеолиз запасных белков в семенах растений представляет собой сложный, регулируемый процесс, включающий в себя последовательное действие нескольких протеолитических ферментов [1]. В настоящее время этот процесс значительно лучше изучен на семенах двудольных растений. Установлено, что он состоит по крайней мере из двух основных стадий. Первая стадия — гидролиз запасных белков — у двудольных растений заключается в их модификации путем ограниченного протеолиза и осуществляется протеиназами, либо синтезируемыми в процессе прорастания семян, либо уже присутствующими в покоящихся семенах. Второй этап — глубокий гидролиз модифицированных на первой стадии запасных белков до небольших пептидов и аминокислот — осуществляется, как правило, протеиназами, которые синтезируются в прорастающих семенах. В настоящей статье

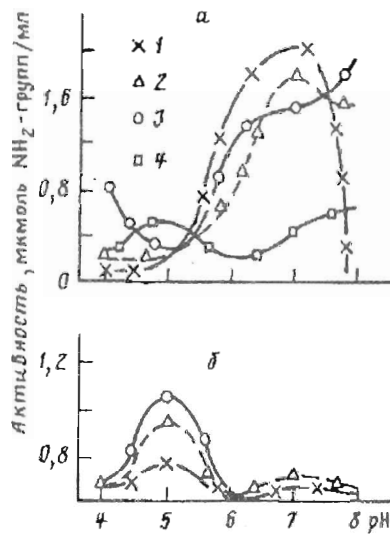
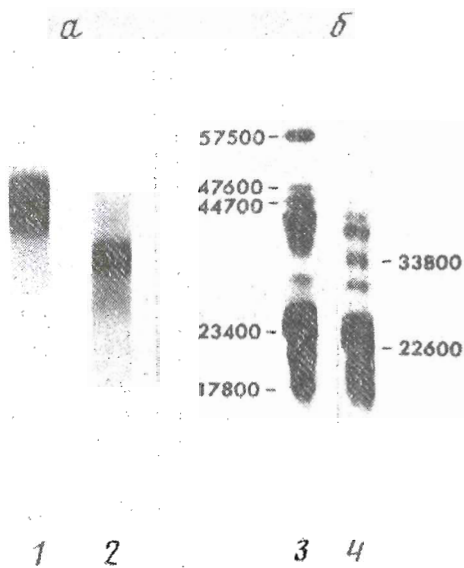


Рис. 2

Рис. 1. Электрофореграммы 13S-глобулина в полиакриламидном геле в отсутствие (а) и присутствии (б) додецилсульфата натрия до расщепления (1, 3) и после расщепления металлопротеиназой (2, 4)

Рис. 2. pH-Зависимость протеолитической активности в экстрактах семян гречихи. Субстраты — 13S-глобулин из покоящихся семян (а) и модифицированный 13S-глобулин, полученный из семян, прораставших в течение 3 сут (б). Экстракты — покоящиеся семена (1) и семена, прораставшие 2 (2), 3 (3), 5 сут (4)

рассматривается ход процесса гидролиза запасных белков в прорастающих семенах гречихи.

Главный запасной белок семян гречихи — 13S-глобулин, составляющий около 16% общего белка этих семян [2], имеющий молекулярную массу около 280 кДа и состоящий из субъединиц с M от 57,5 до 17,8 кДа (рис. 1б). При прорастании семян гречихи 13S-глобулин подвергается расщеплению протеолитическими ферментами и на 4-й день прорастания не обнаруживается в экстрактах семян электрофоретическими и иммунохимическими методами. Как и в случае большинства запасных белков семян двудольных растений, у протеолиза 13S-глобулина выделяются две основные стадии [3]. Первой стадией процесса гидролиза является модификация белка путем его ограниченного протеолиза, протекающая в первые 3 дня прорастания семян под действием ферментов с оптимумом активности в нейтральной области pH (рис. 2а). В свою очередь модифицированный белок подвергается глубокому гидролизу протеиназами, синтезируемыми *de novo* в прорастающих семенах и имеющими оптимум активности в кислой области pH (рис. 2б).

Было установлено, что в прорастающих семенах гречихи ограниченный протеолиз 13S-глобулина осуществляется металлопротеиназой, присутствующей в покоящихся семенах. Этот фермент имеет молекулярную массу 34 кДа, один ион Zn^{2+} в активном центре и оптимум активности в слабощелочной области pH (табл. 1). Выделенная нами из покоящихся семян гречихи металлопротеиназа (КФ 3.4.24) [4] — фактически первый фермент класса металлопротеиназ, полученных из растительных объектов в высокоочищенном состоянии, хотя возможность участия такого рода ферментов в гидролизе запасных белков исследовалась на семенах тыквы [5], сои [6] и клеверины [7]. Фермент гидролизует пептидные связи, образованные аминогруппами гидрофобных и ароматических аминокислот, и в этом отношении весьма сходен с аналогичными ферментами животного и

Протеиназы, участвующие в деградации 13S-глобулина в семенах гречихи

| Фермент | Источник | Мол. масса, кДа | Число субъединиц | pH-оптимум | pI | Ссылка |
|-------------------------|--------------|-----------------|------------------|------------|------------|--------|
| Металлопротеиназа | Сухие семена | 34,0 | 1 | 8,2 | 9,6 | [4] |
| Цистеиновая протеиназа | Проростки | 71,0 | 3 | 5,5 | 4,5 | [8] |
| Карбоксипептидаза | * | 78,5 | 1 | 5,3 | 5,8 | [8] |
| Аспартильная протеиназа | Сухие семена | 28,0 | 1 | 3,5 | 4,2 6,3 | [15] |

Таблица 2

Действие цистеиновой протеиназы и карбоксипептидазы на 13S-глобулин, полученный из покоящихся семян гречихи (А) и 3-дневных проростков (Б) *

| Препарат фермента | А | Б |
|--|------|-----|
| Контроль (без ферментов) | 300 | 180 |
| Цистеиновая протеиназа | 250 | 34 |
| Цистеиновая протеиназа + карбоксипептидаза | н.о. | 0 |

* Приведено содержание 13S-глобулина в инкубационной смеси после гидролиза (мкг).

бактериального происхождения, хотя специфичность металлопротеиназы семян гречихи более узкая, чем у металлопротеиназ животных и микроорганизмов [4]. При действии металлопротеиназы на 13S-глобулин происходит расщепление высокомолекулярных кислых субъединиц с M 57,5, 47,6 и 44,7 кДа и появляются фрагменты с меньшими молекулярными массами (рис. 1б). При этом в молекуле белка расщепляется около 1,5% пептидных связей [4]. При анализе 13S-глобулина электрофорезом в ПААГ в неденатурирующих условиях отмечается характерное для расщепленного белка увеличение электрофоретической подвижности (рис. 1а). Однако молекулярная масса модифицированного 13S-глобулина меняется незначительно и сохраняются иммунохимические свойства, поскольку исходный и модифицированный белки обладают полной антигенной идентичностью. Это указывает на то, что ограниченный протеолиз 13S-глобулина в прорастающих семенах гречихи, осуществляемый металлопротеиназой, не затрагивает основных структурных элементов, определяющих стабильность четвертичной структуры молекулы этого белка.

Второй этап гидролиза 13S-глобулина в прорастающих семенах гречихи заключается в глубоком расщеплении модифицированного на первом этапе металлопротеиназой белка до небольших пептидов и аминокислот. Основную роль в этом процессе играют цистеиновая протеиназа и карбоксипептидаза, синтезируемые *de novo* в прорастающих семенах [8]. Молекулярные массы цистеиновой протеиназы и карбоксипептидазы составляют 71 и 78,5 кДа, а их оптимумы активности находятся в кислой области pH и равны 5,5 и 5,3 (табл. 1). Если карбоксипептидаза — мономерный белок, состоящий из одной полипептидной цепи, то цистеиновая протеиназа из прорастающих семян гречихи представляет собой тример из трех полипептидных цепей с $M \sim 24$ кДа. Этот фермент обладает широкой специфичностью действия, однако хорошо гидролизует только модифицированный 13S-глобулин и практически не расщепляет белок, не модифицированный металлопротеиназой (табл. 2). Участие карбоксипептидазы в процессе гидролиза приводит к увеличению его скорости и к более глубокому расщеплению

белка (табл. 2). Изучение специфичности действия этого фермента показало, что он достаточно эффективно гидролизует синтетические субстраты, расщепляемые карбоксипептидазами типа А и В.

Необходимо отметить, что реакция расщепления модифицированного 13S-глобулина цистеиновой протеиназой в пробирке быстро заканчивается и белок остается практически негидролизованным. Однако при проведении этой же реакции в условиях микродиализа, при постоянном удалении образующихся продуктов гидролиза, белок хорошо и полностью гидролизует. Это свойство цистеиновой протеиназы может иметь важное физиологическое значение. Известно, что в прорастающих семенах местом оттока гидролизуемых запасных веществ (белков, углеводов, фитина) служит развивающаяся зародышевая ось. В связи с этим можно предполагать, что постоянный отток продуктов гидролиза модифицированного 13S-глобулина, образующихся под действием цистеиновой протеиназы, поддерживает фермент в активном состоянии в зависимости от потребностей развивающегося проростка.

Высказанные выше соображения о механизме гидролиза главного запасного белка семян гречихи 13S-глобулина в процессе прорастания семян и о последовательности участия в нем различных протеолитических ферментов носят пока предположительный характер. Одним из наиболее весомых доказательств в пользу этих соображений может быть установление факта внутриклеточной локализации всех участников этого процесса и возможности, таким образом, их взаимодействия с запасным белком при его гидролизе. В связи с вышеизложенным нами была проведена работа по изучению внутриклеточной локализации протеиназ, участвующих в деградации 13S-глобулина семян гречихи.

Известно, что в семенах двудольных растений запасные белки локализованы в специализированных клеточных органеллах, называемых белковыми телами или алейроновыми зернами [9—11]. У многих семян в этих органеллах присутствуют также значительные количества фосфорсодержащего запасного вещества — фитина, представляющего собой преимущественно кальциево-магниевые соли инозитфосфорной кислоты. В покоящихся семенах гречихи клетки семядолей плотно заполнены белковыми телами с фитиновыми глобоидами. Они имеют размеры в среднем 2—8 мкм и плавучую плотность 1,47—1,51 г/см³ [12]. При прорастании семян в белковых телах начинается гидролиз запасных веществ, сопровождающийся вакуолизацией этих органелл. При этом увеличиваются (или появляются новые) светлые полости, в основном вокруг глобоидов. Сами белковые тела при этом увеличиваются в размерах до 2—10—12 мкм, а их плавучая плотность снижается до 1,40—1,47 г/см³ [13]. За период с 3-го по 5-й день прорастания семян количество белка в них заметно снижается и светлые полости начинают занимать все больше места. Такие белковые тела уже можно называть вакуолями. Они имеют размеры 3—12 мкм и плавучую плотность 1,31—1,35 г/см³ [14]. В дальнейшем эти небольшие вакуоли сливаются и образуют центральную клеточную вакуоль.

Нами были разработаны методы получения белковых тел из покоящихся и прорастающих семян гречихи и вакуолей из прорастающих семян [12, 13] и были получены высокоочищенные препараты фракций этих органелл (рис. 3). Поскольку металлопротеиназа, осуществляющая в опытах *in vitro* ограниченный протеолиз, действительно локализована вместе с 13S-глобулином в белковых телах, стадия ограниченного протеолиза с ее участием может иметь место *in vivo* на ранних этапах прорастания семян (табл. 3).

Также было установлено, что в белковых телах, полученных из семядолей семян гречихи, прораставших в течение 4 дней, активность металлопротеиназы практически отсутствует. В то же время 90% от всей протеолитической активности в этих органеллах, способной гидролизовать модифицированный 13S-глобулин, приходится на долю цистеиновой протеиназы, синтезируемой при прорастании семян (табл. 4). В вакуолях из 4-дневных проростков гречихи активность цистеиновой протеиназы начинает снижаться и составляет уже только 59%. Одно-

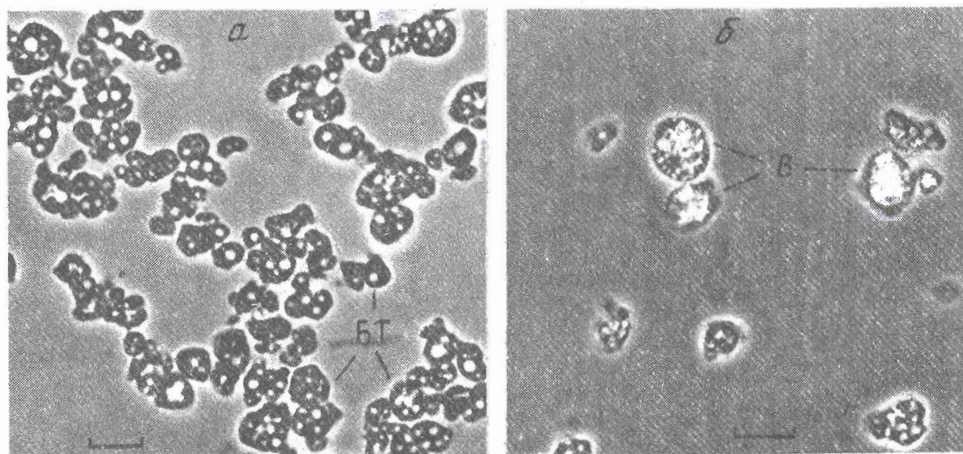


Рис. 3. Фракции белкозапасующих органелл из семядолей проростков гречихи (фазовый контраст). а — белковые тела (БТ), б — вакуоли (В). Горизонтальные метки соответствуют 10 мкм

временно в процессе вакуолизации белковых тел происходило резкое увеличение активности аспартильной протеиназы — типично лизосомального фермента: от 2% в белковых телах 4-дневных проростков до 34% в вакуолях из этих же проростков [14]. Этот фермент был выделен нами ранее из покоящихся семян гречихи и охарактеризован [15]. Полученные данные указывают на то, что аспартильная протеиназа, обладающая еще более кислым рН-оптимумом активности (при рН 3,5), чем цистеиновая протеиназа, может подключаться к гидролизу запасных белков на последних его этапах и способствовать более полному его протеканию.

Полученные таким образом результаты позволили предложить схему гидролиза 13S-глобулина в прорастающих семенах гречихи с участием изученных протеолитических ферментов. Согласно этой схеме, расщепление 13S-глобулина в семенах гречихи инициируется металлопротеиназой, которая уже присутствует в белковых телах покоящихся семян и осуществляет ограниченный протеолиз или модификацию этого белка при нейтральных значениях рН. Этот этап заканчивается на 3-и сут прорастания семян. Модифицированный 13S-глобулин на втором этапе деградации подвергается глубокому гидролизу, осуществляемому синтезируемыми *de novo* при прорастании семян цистеиновой протеиназой и карбоксипептидазой. Этот процесс происходит в период с 3-х по 5-е сут прорастания семян при слабокислых значениях рН и, по-видимому, при постоянном регулировании концентрации продуктов гидролиза со стороны зародышевой оси. При дальнейшем снижении рН в вакуолизирующихся белковых телах (начиная с 4-х сут прорастания) к гидролизу белка подключается и аспартильная протеиназа.

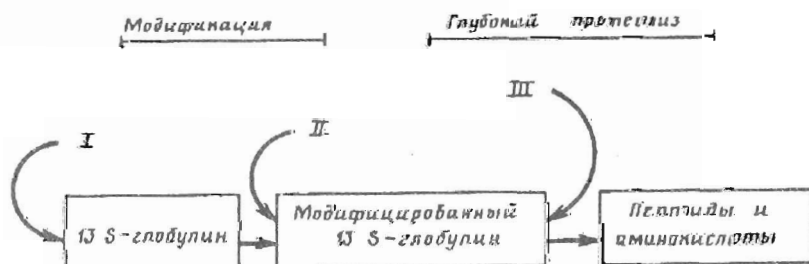


Схема протеолиза 13S-глобулина в прорастающих семенах гречихи (I — металлопротеиназа, II — цистеиновая протеиназа + карбоксипептидаза, III — аспартильная протеиназа)

Таблица 3

Содержание (ед. акт./мг белка) металлопротеиназы и 13S-глобулина* (ОЕ₄₉₂/мг белка) во фракции белковых тел (БТ) и цитоплазматической фракции (ЦТ) клеток семян покоящихся семян гречихи

| Препарат | Содержание в | | БТ/ЦТ |
|-------------------|--------------|------|-------|
| | БТ | ЦТ | |
| Металлопротеиназа | 1,37 | 1,03 | 1,33 |
| 13S-глобулин | 2,52 | 0,57 | 4,42 |

* Определяли иммуноферментным анализом.

Таблица 4

Доля активности отдельных протеиназ от общей протеолитической активности (%) по отношению к модифицированному 13S-глобулину в белокзапасующих органеллах из 4-дневных проростков гречихи

| Субклеточная фракция | Аспартильная протеиназа * | Цистеиновая протеиназа ** |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Белковые тела | 2 | 90 |
| Вакуоли | 34 | 59 |

* Определяли в присутствии пепстатина.

** Определяли в присутствии *p*-хлормеркурибензоата.

В пользу возможности существования описанного хода гидролиза 13S-глобулина *in vivo* свидетельствуют также данные, полученные при проведении реконструкции протеолитической системы, которая осуществляет *in vitro* полную деградацию этого белка [16]. При этом было показано, что в результате последовательного действия металлопротеиназы из покоящихся семян и цистеиновой протеиназы с карбоксипептидазой из прорастающих семян гречихи происходит полный гидролиз 13S-глобулина. В то же время этот белок, не обработанный предварительно металлопротеиназой, практически не гидролизовался протеолитическими ферментами из прорастающих семян гречихи.

Таким образом, полный гидролиз главного запасного белка 13S-глобулина осуществляется в прорастающих семенах гречихи в результате последовательного действия вышеописанных протеолитических ферментов.

Работа финансировалась по программе «Международные проекты» Министерства науки России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shutov A. D., Vaintraub J. A. // *Phytochemistry*. 1987. V. 26. № 6. P. 1557—1566.
2. Белозерский М. А., Емцева И. Б. // *Биохимия*. 1976. Т. 35. Вып. 1. С. 152—157.
3. Dunaevsky Y. E., Belozersky M. A. // *Physiol. Plant.* 1989. V. 75. P. 424—428.
4. Belozersky M. A., Dunaevsky Y. E., Voskoboinikova N. E. // *Biochem. J.* 1990. V. 271. P. 677—682.
5. Hara J., Matsubara H. // *Plant Cell Physiol.* 1980. V. 21. P. 219—232.
6. Bond H. M., Bowles D. J. // *Plant Physiol.* 1983. V. 72. P. 345—350.
7. Dalkin K., Marcus S., Bowles D. J. // *Planta*. 1983. V. 157. P. 531—535.
8. Dunaevsky Y. E., Belozersky M. A. // *Planta*. 1989. V. 179. P. 316—322.
9. Pernollet J. C. // *Phytochemistry*. 1978. V. 17. № 9. P. 1473—1480.
10. Weber E., Neumann D. // *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 1980. V. 175. P. 279—306.
11. Соболев А. М. Запасание белка в семенах растений. М.: Наука, 1985. 112 с.
12. Epidina E. N., Dunaevsky Y. E., Belozersky M. A. // *J. Exp. Bot.* 1990. V. 41. № 229. P. 969—977.

13. Элпидина Е. Н., Дунаевский Я. Е., Белозерский М. А.//Биохимия. 1992. Т. 57. Вып. 5. С. 767—776.
14. Элпидина Е. Н., Дунаевский Я. Е., Белозерский М. А.//Биохимия. 1992. Т. 57. Вып. 10. С. 1527—1531.
15. Белозерский М. А., Дунаевский Я. Е., Руденская Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1984. Т. 49. Вып. 3. С. 479—485.
16. Дунаевский Я. Е., Белозерский М. А., Воскобойникова Н. Е.//Биохимия. 1991. Т. 56. Вып. 8. С. 1369—1373.

Поступила в редакцию
6.VII.1993

M. A. Belozersky, Y. E. Dunaevsky, E. N. Elpidina

SEQUENTIAL PARTICIPATION OF PROTEASES IN HYDROLYSIS OF THE MAIN STORAGE PROTEIN IN BUCKWHEAT SEEDS

*A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Moscow*

A system of proteolytic enzymes performing degradation of the main storage protein of buckwheat seeds, 13S globulin, has been studied. Hydrolysis of this protein in germinating buckwheat seeds proceeds in two discrete stages: a limited proteolysis or modification of the protein by metalloproteinase present in dry seeds, and a profound hydrolysis of the modified protein to small peptides and amino acids by cysteine proteinase and carboxypeptidase synthesized *de novo* during seed germination. Aspartic proteinase takes part in the process at the late stages of the protein degradation. All enzymes participating in the hydrolysis of 13S globulin are localized in the protein storing organelles — protein bodies and vacuoles of the buckwheat seed cotyledonary cells.