



УДК 577.322.(53 + 6):539.26

**СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ЛЕКТИНА ГОРОХА
С D-МАННОПИРАНОЗОЙ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 2.1 Å**© 1998 г. С. Н. Ружейников[#], И. Ю. Михайлова, И. Н. Цыганник,
В. Пэнгборн*, В. Дюэкс*, В. З. ПлетневИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Медицинский исследовательский центр им. Хауптмана-Вудвард, Буффало, Нью-Йорк

Поступило в редакцию 02.12.97 г. Принято к печати 22.12.97 г.

Методом молекулярного замещения установлена структура нового кристаллического комплекса (пространственная группа $P2_12_12_1$, параметры ячейки: a 73.926, b 104.083, c 64.837 Å) лектина гороха (*Pisum sativum*, димер, $M \sim 52$ кДа) с *D*-маннопиранозой при разрешении 2.1 Å. После завершения кристаллографического уточнения величина *R*-фактора составляет 16.1%. Показано, что молекула маннозы фиксируется шестью водородными связями с остатками Asp81, Gly99, Asn125, Ala217 и Glu218.

Ключевые слова: лектин гороха, кристаллический комплекс, рентгеноструктурный анализ.

Лектин гороха (*Pisum sativum*, димер, $M \sim 52$ кДа) – Ca^{2+} , Mn^{2+} -содержащий белок, проявляющий высокую моносахаридную специфичность к маннозе, глюкозе и производным этих сахаров, например α -метил-*D*-маннопиранозиду [1].

Для этого белка установлена трехмерная структура свободной формы [1], а также его комплексов с триманнозидом [2], иодпроизводным глюкозы [3] и *D*-глюкопиранозой [4].

Используемая в настоящей работе кристаллическая форма комплекса лектина с *D*-маннопиранозой была получена сокристаллизацией белка с моносахаридом по методике, изложенной в работе [5]; она относится к пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной ячейки a 73.926, b 104.083, c 64.837 Å, в независимой части ячейки находится одна димерная молекула.

Сбор дифракционных данных производился на автодифрактометре Rigaku R-AXIS II (Япония) с двумерным детектором при комнатной температуре до разрешения 2.1 Å.

Структуру комплекса определяли методом молекулярного замещения с использованием координат комплекса лектина гороха с *D*-глюкопиранозой [4] при помощи программного комплекса X-PLOR [6].

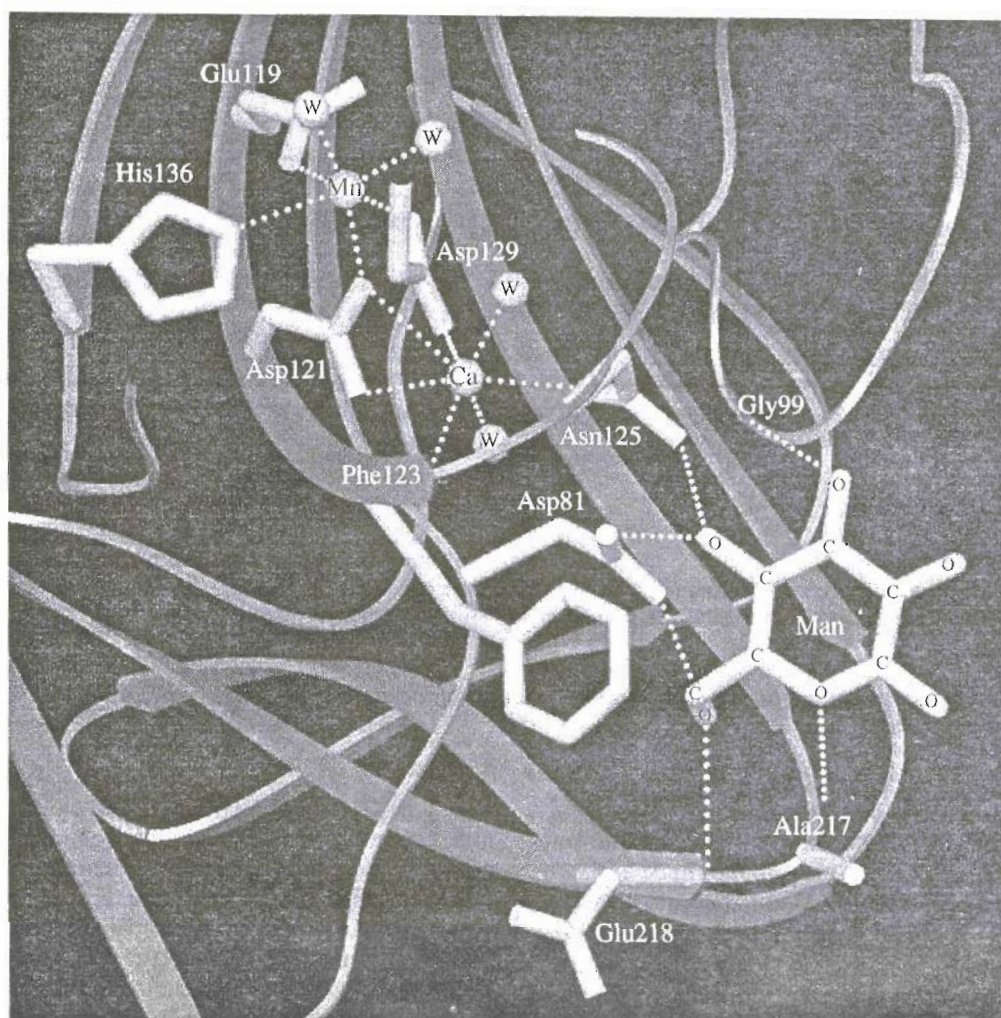
Молекулярно-графическую правку модели и кристаллографическое уточнение проводили на графической станции Silicon Graphics Iris Indigo

(США) с использованием программных комплексов X-PLOR [6] и CHAIN [7]. В процессе уточнения структуры было локализовано 258 молекул воды, образующих упорядоченную сольватную оболочку белковой глобулы. Кроме того, был учтен тот факт, что в свободном состоянии в растворе *D*-манноза находится в двух предпочти-

Таблица 1. Статистика уточнения

Полнота экспериментальных данных, %	98.5
Число независимых отражений:	
общее	27369
использовано в уточнении ($F_0 > 2\sigma(F_0)$)	24554
Число неводородных атомов (включая воду)	3878
<i>R</i> -фактор ($F_0 > 2\sigma(F_0)$), %	16.1
R_{free} -фактор (по 10% данных), %	18.8
Среднеквадратичные отклонения параметров от идеальных значений:	
связь, Å	0.009
угол, град	1.922
торсионный угол, град	26.62
планарность, град	1.294
Статистика ϕ , ψ -распределения (исключая Gly, Pro) на карте Рамачандрана, %	
в наиболее благоприятных областях	88.4
в дополнительно разрешенных областях	11.0
в запрещенных областях	0.6
Случайная позиционная ошибка по методу Лузатти [8], Å	0.22

[#] Автор для переписки (тел.: 330-75-10, e-mail: snr@tek.siocb.ras.ru).



Стереохимическая структура активного центра комплекса лектина с *D*-маннозой.

тельных формах, соответствующих α - и β -конформациям аномерного центра пиранозного цикла (соответственно 67 и 33% общего содержания). На последних этапах процедуры была проведена оптимизация коэффициента заполнения для молекул моносахарида, находящихся в связанном состоянии. Окончательные результаты уточнения приведены в табл. 1.

Как и следовало ожидать, основные структурные черты исследуемого комплекса близки к таковым в структуре свободного лектина и ряда его углеводных комплексов [1–4]. Довольно редко встречающаяся в белковых структурах конфигурацию β -изгиба типа V [9] принимает участок Thr27–Lys30: $\varphi_2 = -74^\circ$, $\psi_2 = 124^\circ$, $\varphi_3 = 86^\circ$, $\psi_3 = -46^\circ$. Формально это приводит к тому, что остаток Glu29, составляющий 0.6% общего числа остатков, попадает в запрещенную область на карте Рамачандрана (табл. 1).

Координационные сферы ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} практически не отличаются от соответствующих

участков в структуре комплекса лектина гороха с *D*-глюкопиранозой [4]; среднеквадратичное отклонение в длинах связей между двумя комплексами составляет 0.10 Å, что заведомо меньше случайной позиционной ошибки по методу Лузатти [8] (табл. 1).

Молекула *D*-маннозы в классической конформации кресла располагается в небольшой полости на поверхности каждого мономера белка вблизи металлсвязывающего центра и удерживается шестью водородными связями с аминокислотными остатками Asp81, Gly99, Asn125, Ala217 и Glu218 (рисунок, табл. 2). При этом различие в расположении α - и β -форм сахара в активном центре незначительно; среднеквадратичное отклонение, рассчитанное по неводородным структурно-идентичным атомам, составляет 0.2 Å, что не выходит за пределы случайной позиционной ошибки [8]. Средний коэффициент заполнения углеводом активных центров белка составляет 92%, что свидетельствует о правильности

Таблица 2. Усредненная система водородных связей в углеводсвязывающем центре лектина*

Аминокислотный остаток	Атом D-маннозы	Расстояние, Å
Gly99(NH)	O3	2.76
Asn125(N ^{δ2} H)	O4	2.78
Ala217(NH)	O5	3.15
Gly218(NH)	O6	3.18
Asp81(O ^{δ1})	(H)O4	2.76
Asp81(O ^{δ2})	(H)O6	2.74

* В скобках указаны атомы и группы атомов, непосредственно участвующие в образовании водородных связей.

выбранной методики кристаллизации комплекса. Усредненное по мономерам лектина отношение коэффициентов заполнения для α- и β-форм D-маннозы близко к их соотношению в растворе (2 : 1) и составляет 1.8. Данный факт указывает на то, что различие в энергиях связывания α- и β-форм существенно ниже, чем разность энергетических уровней конформаций маннозы.

Более высокую константу связывания D-маннозы по сравнению с D-глюкозой (в 2.25 раза [10]) можно объяснить влиянием дальних электростатических взаимодействий молекулы моносахарида с белковой глобулой, а также различиями в соотношении α- и β-форм у глюкозы и маннозы.

Дальнейшие исследования других кристаллических комплексов лектина гороха с различными углеводами, в том числе с α-метил-D-маннопира-

нозидом, обладающим наибольшим сродством к этому белку [10], позволяет выяснить структурные основы его углеводной специфичности.

Представленное в данной публикации исследование было выполнено частично при поддержке грантов № 95-04-11640а РФФИ и 03.0002Н-322 ГНТПР "Новейшие методы биоинженерии".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Einspahr H., Parks E.H., Suguna K., Subramanian E., Suddath F.L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 16518–16527.
2. Rini J.M., Hardman K.D., Einspahr H., Suddath F.L., Carver J.P. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 10126–10132.
3. Лобсанов Ю.Д., Плетнев В.З. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 122–125.
4. Плетнев В.З., Ружейников С.Н., Цыганник И.Н., Михайлова И.Ю., Дюэкс В., Гош Д., Пэнгборн В. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 469–478.
5. Михайлова И.Ю., Цыганник И.Н., Фонарев Ю.Д., Куликов Ю.В., Плетнев В.З. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 479–480.
6. Brunger A.T. X-PLOR (Version 3.1) Manual. Yale University, New Haven and London, 1992.
7. Jones T.A. // J. Appl. Crystallogr. 1978. V. 11. P. 268–272.
8. Luzatti P.V. // Acta Cryst. 1952. V. 5. P. 802–810.
9. Chou P.Y., Fasman G.D. // J. Mol. Biol. 1977. V. 115. P. 135–175.
10. Shimura K., Kasai K. // J. Biochem. 1996. V. 120. P. 1146–1152.

The Structure of the Pea Lectin–D-mannopyranose Complex at a 2.1 Å Resolution

S. N. Ruzheynikov*, I. Yu. Mikhailova*, I. N. Tsygannik*, W. Pangborn**,
W. Duax**, and V. Z. Pletnev*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Hauptman–Woodward Medical Research Center, Buffalo, NY, 14203 USA

The structure of a new crystal complex ($P2_12_12_1$ spatial group, cell dimensions: a 73.926, b 104.083, and c 64.837 Å) of pea lectin (*Pisum sativum*, dimer, molecular mass ca. 52 kDa) with D-mannopyranose was established by the molecular replacement approach at a resolution of 2.1 Å. After crystallographic refinement, the value of the R -factor was 16.1%. The mannose molecule was shown to be fixed by six hydrogen bonds with Asp81, Gly99, Asn125, Ala217, and Glu218.

Key words: pea lectin, crystal complex, X-ray analysis