



УДК 577.156.02

**ХИМОТРИПСИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ЦЕНТР ИНГИБИТОРА
СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ КАРТОФЕЛЯ***Валуева Т. А., Зимачева А. В., Мосолов В. В.**Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва*

При ограниченном протеолизе ингибитора сериновых протеиназ из картофеля химотрипсином при рН 3 происходит расщепление одной пептидной связи в молекуле ингибитора с одновременным снижением активности по отношению к химотрипсину (активность ингибитора по отношению к трипсину остается неизменной). Последующая инкубация модифицированного ингибитора с химотрипсином при рН 5,8 приводит к резинтезу гидролизованной пептидной связи и восстановлению активности ингибитора. При гель-хроматографии окисленного надмуравьиной кислотой модифицированного ингибитора выделены два пептидных фрагмента, один из которых соответствует N-концевой и второй — C-концевой части молекулы белка. На основании анализа концевых аминокислот и аминокислотного состава фрагментов сделано заключение, что участок пептидной цепи Leu⁷⁵ — Val⁷⁶ входит в состав химотрипсинсвязывающего реактивного центра ингибитора сериновых протеиназ из картофеля.

Изучение взаимодействия с природными ингибиторами важно для понимания механизма действия протеолитических ферментов, в особенности механизма связывания и превращения белковых субстратов [1—3]. Особый интерес в связи с этим представляет исследование строения «реактивных центров» природных белковых ингибиторов, т. е. тех участков их молекул, которые вступают в непосредственный контакт с активным центром фермента [4].

В предыдущей работе [5] изучено строение трипсинсвязывающего центра ингибитора сериновых протеиназ из картофеля с рI 7,3, выделенного в нашей лаборатории [6]. На основании полученных данных было высказано предположение о наличии в молекуле ингибитора химотрипсинсвязывающего центра, отличного от центра, ответственного за связывание трипсина [5]. Представленная работа посвящена изучению строения химотрипсинсвязывающего центра ингибитора.

Поскольку подавляющее большинство «двуглавых» ингибиторов протеиназ, имеющих два различных центра связывания для трипсина и химотрипсина, содержат в положении P₁ в химотрипсинсвязывающем центре остатки лейцина, тирозина и фенилаланина [7—9], подход, основанный на химической модификации белка, представлялся малоперспективным. В связи с этим в работе был использован метод ограниченного протеолиза ингибитора химотрипсином в кислой среде. Как показали впервые Ласковский и сотр. [10], в этих условиях происходит специфический гидролиз пептидной связи P₁—P₁', расположенной в реактивном центре белкового ингибитора.

О наличии модифицированной формы ингибитора, т. е. ингибитора, содержащего разорванную пептидную связь в реактивном центре, судили

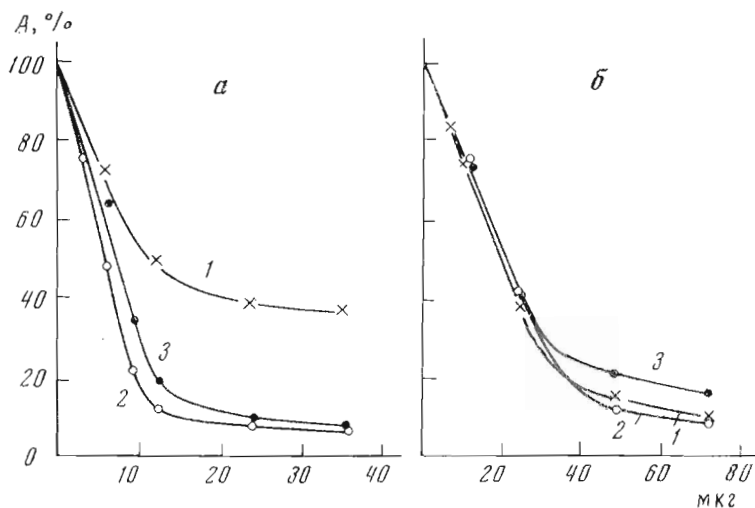


Рис. 1. Зависимость ингибирования химотрипсина (а) и трипсина (б) от концентрации нативного и модифицированного ингибиторов: 1 — ингибитор, инкубированный с химотрипсином; 2 — контрольный образец, инкубированный без фермента; 3 — модифицированный ингибитор после повторной инкубации с химотрипсином при рН 5,8. Ось ординат — активность фермента (А), ось абсцисс — концентрация ингибитора

по результатам определения N-концевых аминокислотных остатков. В гидролизате обработанного дансилхлоридом контрольного образца (инкубированного в течение 48 ч при рН 3 в отсутствие химотрипсина) обнаружено дансилпроизводное метионина (N-концевая аминокислота ингибитора [6]) наряду с ϵ -дансиллизиним и O-дансилтирозином. В опытном образце, подвергнутом инкубации с ферментом в тех же условиях, кроме упомянутых выше дансилпроизводных, обнаружен дансилвалин. Этот результат показывает, что в присутствии химотрипсина происходит гидролиз пептидной связи, в образовании которой участвует аминогруппа остатка валина. Чтобы установить, действительно ли гидролизуемая ферментом связь расположена в реактивном центре ингибитора, было исследовано влияние обработки ингибитора химотрипсином при рН 3 на его активность. Согласно проведенным экспериментам, активность ингибитора в результате протеолитической модификации снижалась по отношению к химотрипсину приблизительно на 50% (рис. 1а). В то же время модифицированный ингибитор сохранял 100% активности по отношению к трипсину (рис. 1б). Эти данные согласуются с представлением о том, что гидролизуемая химотрипсином пептидная связь действительно входит в состав химотрипсинсвязывающего центра ингибитора. Сохранение у модифицированного ингибитора полной активности по отношению к трипсину подтверждает сделанный ранее вывод о наличии в молекуле ингибитора двух различных центров связывания для трипсина и химотрипсина [5]. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что снижение активности по отношению к химотрипсину — результат гидролиза специфической пептидной связи, а не следствие изменения общей конформации белковой молекулы.

По данным Ласковского и др. [11], в присутствии фермента модифицированный ингибитор находится в равновесии с нативным ингибитором. Поскольку положение равновесия при гидролизе пептидной связи в сильной степени зависит от рН, то, изменяя рН среды, можно сдвинуть равновесие в сторону образования нативного ингибитора, т. е. осуществить ресинтез пептидной связи в реактивном центре ингибитора. Как показано в работе Л. М. Гиодмана и сотр. [12], наиболее благоприятные условия

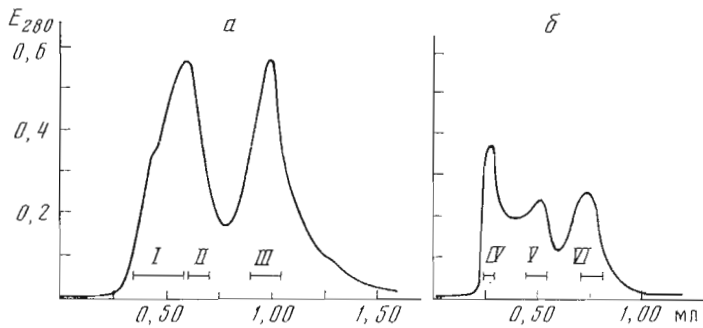


Рис. 2. Гель-хроматография препарата ингибитора, модифицированного химотрипсином и окисленной надмуравьиной кислотой. *a* — колонка с сефадексом G-75; *b* — рехроматография фракций I и II на колонке с сефадексом G-150. Горизонтальной чертой отмечены фракции, отобранные для исследования

для синтеза пептидной связи ($-\Delta F$ относительно невелика) находятся в области pH 4—7. На этом основании в следующей серии опытов смесь, содержащую нативный и модифицированный ингибитор, полученную в результате инкубации нативного ингибитора с химотрипсином при pH 3, доводили до pH 5,8 и инкубировали при 37° в течение 48 ч с новой порцией химотрипсина (молярное отношение ингибитор — фермент 50 : 1). Как видно из результатов опыта (рис. 1), при этом происходит восстановление антихимотриптической активности, которая достигает почти того же уровня, как у исходного нативного ингибитора. То, что в этих условиях действительно имеет место ресинтез гидролизованной пептидной связи, подтверждается результатами определения N-концевых аминокислот. В образце модифицированного ингибитора с ресинтезированной пептидной связью почти полностью отсутствовал N-концевой валин. Полученные данные являются дополнительным подтверждением того, что снижение антихимотриптической активности ингибитора в результате ограниченного протеолиза при pH 3 — следствие гидролиза единственной пептидной связи X—Val.

Чтобы установить положение химотрипсинсвязывающего центра в молекуле ингибитора, белок, модифицированный химотрипсином при pH 3, окисляли надмуравьиной кислотой и образующиеся пептиды разделяли с помощью гель-хроматографии на колонках с сефадексами G-75 и G-150 (Superfine). При разделении на колонке (0,3 × 15 см) с сефадексом G-75 (рис. 2*a*) удается получить один фрагмент (III) в достаточно чистом для анализа виде. Объединенные фракции I и II подвергали рехроматографии на колонке с сефадексом G-150 (рис. 2*b*). При этом были получены три пептидных компонента (IV—VI). В компонентах (III)—(VI) определяли N-концевые аминокислоты, а в компоненте (III), кроме того, C-концевые аминокислоты с помощью карбоксипептидазы А. Фракция IV содержит небольшое количество пептидного материала, в то же время она характеризуется относительно высокой оптической плотностью при 280 нм. При определении N-концевой аминокислоты в ней преимущественно обнаружен изолейцин. Можно предположить, что эта фракция содержит химотрипсин, который не был предварительно удален из инкубационной смеси. Фракция V по результатам анализа концевых групп, а также на основании аминокислотного состава представляет собой немодифицированный ингибитор. Как показали проведенные исследования, N-концевой аминокислотой компонента (III) является валин. После 4-часового гидролиза этого компонента карбоксипептидазой А освобождается 0,67 моль серина на 1 моль пептида и следовые количества лейцина. Так как серин является также C-концевой аминокислотой нативного ингибитора [6],

Аминокислотный состав N- и C-концевых фрагментов модифицированного ингибитора с рI 7,3

Аминокислота	N-Концевой фрагмент	C-Концевой фрагмент	Сумма	Нативный ингибитор [6]
Asp	6,36 (6)	4,81 (5)	11	11
Thr	5,42 (6)	3,20 (3)	9	9
Ser	5,36 (5)	3,61 (4)	9	9
Glu	6,10 (6)	5,06 (5)	11	11
Pro	4,31 (4)	3,27 (3)	7	7
Gly	9,47 (9)	6,54 (7)	16	16
Ala	3,36 (3)	3,31 (3)	6	6
Cys ^{1/2}	10,21 (10)	4,27 (4)	14	14
Val	1,00 (1) *	3,15 (3)	4	4
Met	1,00 (1)	—	1	1
Pe	2,31 (3)	2,38 (3)	6	6
Leu	3,26 (3)	3,36 (3)	6	6
Tyr	7,00 (7)	1,34 (1)	8	8
Phe	2,31 (2)	1,00 (1) *	3	3
Lys	5,26 (6)	3,45 (3)	9	9
His	1,00 (1)	1,02 (1)	2	2
Arg	1,52 (2)	1,50 (2)	4	4
Общее число остатков	75	51	126	126
N-Концевой остаток	Метнионин	Валин	Метнионин, валин	Метнионин
C-Концевой остаток	Лейцин	Серин	Лейцин, серин	Серин

* Аминокислота, содержание которой было принято за 1.

пептид (III), очевидно, соответствует C-концевой части молекулы белка. В пептиде (VI), полученном в чистом виде после повторной хроматографии на сефадексе G-150, N-концевым остатком является метнионин-сульфон и C-концевым — лейцин (после 4-часового гидролиза карбоксипептидазой А освобождается 0,7 моль лейцина на 1 моль пептида). Поскольку метнионин занимает N-концевое положение в молекуле ингибитора [6], пептид (VI), очевидно, образован из N-концевой части молекулы белка. Таким образом, на основании полученных данных аминокислота X, карбоксильная группа которой участвует в образовании гидролизуемой химотрипсином пептидной связи, может быть идентифицирована как лейцин.

В таблице приведен аминокислотный состав пептидов (III) (C-концевой фрагмент) и (VI) (N-концевой фрагмент), выделенных из окисленного модифицированного ингибитора, а также обнаруженные концевые группы. C-Концевой фрагмент содержит 51 аминокислотный остаток и N-концевой — 75 аминокислотных остатков. Суммарный аминокислотный состав обоих фрагментов полностью соответствует аминокислотному составу нативного ингибитора. Содержание C-концевого лейцина во фракции VI (0,7 моль) указывает на образование в условиях инкубации с химотрипсином 70% модифицированного ингибитора, что несколько выше, чем можно было ожидать на основании снижения ингибиторной активности (~50%) (рис. 1а). Это расхождение, по-видимому, связано с частичным ресинтезом гидролизованной пептидной связи в модифицированном ингибиторе в результате достаточно длительной преинкубации с ферментом (2 ч, рН 8) в процессе определения ингибиторной активности (см. «Экспериментальную часть»).

Строение химотрипсинсвязывающего центра ингибитора из картофеля на основании полученных данных может быть представлено рис. 3. В его состав входит участок полипептидной цепи, включающий аминокислотную последовательность Leu⁷⁵—Val⁷⁶. Наличие в положении P₁ реактивного центра остатка лейцина, присутствие в положении P₁' остатка с боковой цепью гидрофобного характера и локализация реактивного центра внутри дисульфидной петли типично для строения реактивных центров нескольких

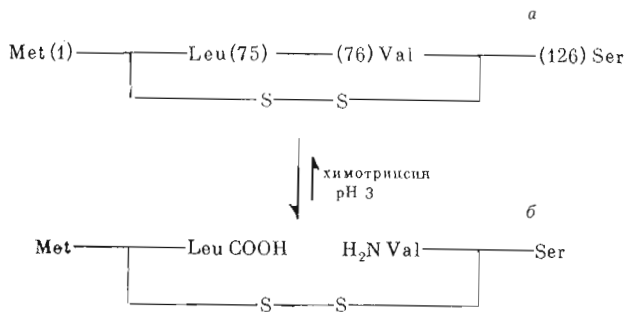


Рис. 3. Структура химотрипсинсвязывающего центра ингибитора из картофеля. а — нативный ингибитор, б — модифицированный ингибитор

исследованных «двуглавых» ингибиторов из растений, действующих на химотрипсин [4, 7, 9, 13].

В соответствии с полученными данными химотрипсинсвязывающий центр располагается ближе к С-концу молекулы ингибитора. Локализация трипсинсвязывающего центра в настоящее время еще не установлена. Однако поскольку молекулы всех изученных «двуглавых» ингибиторов протеиназ характеризуются наличием симметрично расположенных реактивных центров [7, 9, 13], можно высказать предположение, что трипсинсвязывающий центр ингибитора из картофеля должен быть расположен ближе к N-концу молекулы.

Обращают на себя внимание значительные различия в аминокислотном составе между N- и С-концевыми частями молекулы ингибитора (таблица). В первую очередь это касается содержания остатков полуцистина, валина и тирозина. Такой характер распределения аминокислот указывает на существование значительных различий в первичной структуре двух частей молекулы ингибитора. Эти данные, несмотря на их предварительный характер, представляют значительный интерес, так как противоречат существующему взгляду на возникновение «двуглавых» ингибиторов протеиназ в результате дупликации генов одноцентровых ингибиторов [14].

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат ингибитора из клубней картофеля, полученный, как было описано ранее [6]; химотрипсин (КФ 3.4.21.1), обработанный 1-хлор-3-тозиламидо-7-амино-2-гептанолом (ТЛХК-химотрипсин, Worthington, США); трипсин (КФ 3.4.21.4, Spofa, СССР), очищенный перекристаллизацией из сульфата магния; карбоксипептидазу А (КФ 3.4.12.2), обработанную диизопропилфторфосфатом (Worthington, США); этиловый эфир α -N-бензоил-D,L-аргинина и этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина (Reanal, Венгрия).

Для определения ингибиторной активности ингибитор (10—50 мкг/мл) инкубировали с ферментом (трипсин — 78 мкг/мл, химотрипсин — 23 мкг/мл, pH 8) при комнатной температуре и затем определяли остаточную ферментативную активность потенциметрическим методом [15] с использованием pH-стата (Radiometer TTT-1с, Дания). В качестве субстратов использовали этиловый эфир α -N-бензоил-D,L-аргинина для трипсина и этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина для химотрипсина. Время инкубации с ферментом составляло 5 мин для нативного ингибитора и 120 мин для ингибитора, модифицированного химотрипсином [5].

Для получения модифицированного ингибитора 2 мг (0,133 мкмоль) белка растворяли в 0,6 мл 0,4 М уксусной кислоты, содержащей 0,05 М CaCl_2 , и pH раствора доводили до 3 ледяной уксусной кислотой. После

внесения 0,07 мг (0,003 мкмоль) ТЛХК-химотрипсина смесь инкубировали 48 ч при 37°. По окончании инкубации раствор лиофильно высушивали. Высушенный белок (0,06 мкмоль) окисляли при 0° надмуравьиной кислотой [6]. Окисленный белок подвергали гель-хроматографии на колонке (0,3 × 15 см) с сефадексом G-75 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala), уравновешенным 5% уксусной кислотой. Элюцию вели тем же раствором со скоростью 0,5 мл/ч (рис. 2). Оптическую плотность фракций измеряли при 280 нм на высокочувствительном микроспектрофотометре с проточной микрокюветой.

Для определения аминокислотного состава окисленный белок (или пептид) гидролизовали 20 ч 5,7 н. HCl при 110° в вакууме. Анализ аминокислот проводили на анализаторе Liqimat (ФРГ).

Определение N-концевых аминокислот осуществляли дансильным методом по Грею [17], как было описано ранее [6]. Для идентификации производных валина, лейцина и изолейцина использовали тонкослойную хроматографию на полиамидных пластинках в присутствии свидетелей в двух системах растворителей: 1,5% муравьиная кислота и в перпендикулярном направлении бензол — уксусная кислота (9 : 1) [18].

Для определения C-концевой аминокислоты 0,005—0,01 мкмоль белка или пептида инкубировали 4 ч с 19 мкг карбоксипептидазы А в 0,1 мл 0,2 М N-этилморфолинового буфера, рН 8,5, при 37°. Белок осаждали подкислением инкубационной смеси до рН 3 ледяной уксусной кислотой и в супернатанте определяли содержание свободных аминокислот на аминокислотном анализаторе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blow D. M., Wright C. S., Kukla D., Rühlmann A., Steigemann W., Huber R. (1972) *J. Mol. Biol.*, **69**, 137—144.
2. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J., Chothia C. H., Blow D. M. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4212—4228.
3. Blow D. M. (1974) in *Bayer-Symposium V «Proteinase Inhibitors»*, pp. 473—483, Springer, Berlin.
4. Laskowski M., Jr., Sealock R. W. (1974) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), vol. 3, pp. 375—473, Acad. Press, N. Y.
5. Валуева Т. А., Мосолов В. В. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1389—1394.
6. Мосолов В. В., Малова Е. Л., Валуева Т. А., Шульмина А. И. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1449—1457.
7. Odani S., Ikenaka T. (1972) *J. Biochem.*, **71**, 839—848.
8. Birk Y. (1974) in *Bayer-Symposium V «Proteinase Inhibitors»*, pp. 355—361, Springer, Berlin.
9. Stevens F. C., Wuerz S., Krahn J. (1974) in *Bayer-Symposium V «Proteinase Inhibitors»*, pp. 344—354, Springer, Berlin.
10. Ozawa K., Laskowski M., Jr. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 3955—3961.
11. Niekamp C. W., Hixson H. F., Jr., Laskowski M., Jr. (1969) *Biochemistry*, **8**, 16—22.
12. Козлов Л. В., Глинодман Л. М., Орехович В. Н., Валуева Т. А. (1966) *Биохимия*, **31**, 315—321.
13. Wilson K. A., Laskowski M., Sr. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4261—4267.
14. Laskowski M., Jr., Kato I., Leary T. R., Schrode J., Sealock R. W. (1974) in *Bayer-Symposium V «Proteinase Inhibitors»*, pp. 597—611, Springer, Berlin.
15. Lascowski M. (1955) in *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 2, pp. 36—54, Acad. Press., N. Y.
16. Hirs C. H. W. (1956) *J. Biol. Chem.*, **219**, 611—621.
17. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 59P.
18. Woods K. R., Kung-Tsung Wang (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **133**, 369—370.

Поступила в редакцию
22.II.1977

CHYMOTRYPSIN-BINDING SITE OF THE INHIBITOR OF SERINE PROTEINASES FROM POTATOES

VALUEVA T. A., ZIMATCHEVA A. V., MOSOLOV V. V.

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

On limited proteolysis with chymotrypsin at pH 3.0, the splitting of a single peptide bond occurs in the molecule of inhibitor of serine proteinases from potatoes. The modified inhibitor has a reduced activity towards chymotrypsin, but retains full activity against trypsin. Incubation of modified inhibitor with the catalytic amounts of chymotrypsin at pH 5.8 is accompanied by resynthesis of the broken bond and complete restoration of the inhibitory activity against chymotrypsin. Using chromatography on Sephadex G-75 and G-150 of performic acid oxidized modified inhibitor, two peptide fragments were isolated which correspond to N- and C-terminal parts of the molecule. It was inferred from the end-group and amino-acid analyses of the fragments that the Leu⁷⁵-Val⁷⁶ sequence belongs to the chymotrypsin-binding site of the inhibitor (pI 7.3) of serine proteinases from potatoes.
