



УДК 577.154.26.049

ВЛИЯНИЕ РЕАГЕНТОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ  
С КАРБОКСИЛЬНЫМИ ГРУППАМИ, НА  $\beta$ -1,3-ГЛЮКАНАЗУ  
ИЗ *SPISULA SACHALINENSIS*

Сова В. В., Елякова Л. А.

*Тихоокеанский институт биоорганической химии  
Дальневосточного научного центра Академии наук СССР, Владивосток*

Показано, что окись пропилена необратимо ингибирует  $\beta$ -1,3-глюканазу при pH меньше 7, причем субстрат защищает фермент от инактивации. При взаимодействии  $\beta$ -1,3-глюканазы с метиловым эфиром глицина в присутствии *n*-толуолсульфоната *N*-циклогексил-*N'*-[ $\beta$ -(4-метилморфолиний)-этил]карбодимида модифицируется 5 карбоксильных групп, в результате фермент полностью инактивируется. В растворах 8 М мочевины и 5 М хлоридрата гуанидина число модифицируемых карбоксильных групп увеличивается до 7—8. В присутствии субстрата число модифицируемых карбоксильных групп уменьшается до 3. При модификации фермента динитрофенилгексаметилендиамином карбодимидным методом Кошланда включается 2—2,5 остатка амин и сохраняется 40% его активности. Результаты исследования позволяют предполагать существенную роль карбоксильных групп для ферментативной активности  $\beta$ -1,3-глюканазы.

Известно, что карбоксильные группы принимают участие в функционировании лизоцима, ряда протеиназ, гликозидаз и ферментов фосфорного обмена [1—8]. Кроме того, они необходимы для поддержания нативной структуры белков.

Аминокислотный состав  $\beta$ -1,3-глюканазы из *Spisula sachalinensis* отличает высокое содержание дикарбоновых кислот [9]. Показано, что каталитическая активность  $\beta$ -1,3-глюканазы контролируется двумя группами с рК 6,8 и 4,0 [10]. Первая из них может быть имидазольной группой гистидина, вторая — карбоксильной группой глутаминовой или аспарагиновой кислоты.

Чтобы проверить последнее предположение, в данной работе изучалось влияние на каталитическую активность  $\beta$ -1,3-глюканазы некоторых реагентов, модифицирующих карбоксильную группу.

Мы начали наши исследования с изучения действия окиси пропилена на  $\beta$ -1,3-глюканазу. Действие окиси пропилена было проверено ранее на нескольких карбогидразах: лизоциме [11], комплексе сахараза — изомальтаза [12], инвертазе [4]. Было отмечено либо слабое ингибирование [12], либо полное отсутствие его [4, 11]. Однако действие аффинных ингибиторов на основе окиси пропилена на все эти ферменты было успешным.

Окись пропилена ингибирует активность глюканазы при значениях pH  $\leq$  7. Характерно, что при pH 3,2, т. е. в условиях преимущественной

Принятые сокращения: ЦМСЖ — *n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-[ $\beta$ -(4-метилморфолиний)-этил]карбодимид, ДФГА — динитрофенилгексаметилендиамин, ДДЭА — *N*-диазоацетил-*N'*-2,4-динитрофенилэтилендиамин.

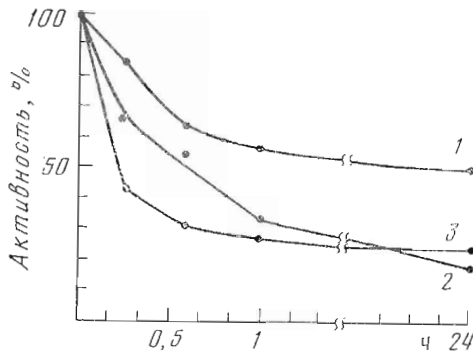


Рис. 1

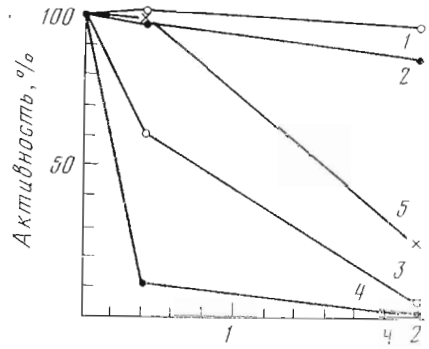


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация β-1,3-глюканазы окисью пропилена при pH 6,0 (1), 4,0 (2), 3,2 (3)

Рис. 2. Влияние окиси пропилена на активность β-1,3-глюканазы: 1 — контрольный раствор фермента; 2 — фермент, бридж-35; 3 — фермент, окись пропилена; 4 — фермент, бридж-35, окись пропилена; 5 — фермент, субстрат, окись пропилена

модификации карбоксильных групп [13], падение ферментативной активности происходит быстрее, чем при pH 4,0 и 6,0 (рис. 1). Добавление к ферменту тех же количеств диэтилового эфира не влияет на ферментативную активность.

Если предположить, что модифицируемые карбоксильные группы принимают непосредственное участие в ферментативном катализе, то субстрат (ламинарин) или его аналог (ламинарибиоза) должны защищать фермент от инактивирующего действия окиси пропилена. Действительно, и ламинарин и ламинарибиоза защищают фермент от инактивирующего действия окиси пропилена (рис. 2, 5). Скорость инактивации фермента увеличивается в присутствии неионогенного детергента бридж-35 (рис. 2, 4).

При действии гидроксилamina на модифицированную окисью пропилена β-1,3-глюканазу реактивации фермента не наблюдалось. Появление гидроксамовых кислот было зафиксировано качественной реакцией [14].

Для модификации карбоксильных групп белков в последнее время широко используется карбодимидный метод [15], заключающийся в активации карбоксильных групп водорастворимым карбодимидом и последующей обработкой аминокомпонентом, приводящей к образованию новой пептидной связи в ответвлении. Для модификации β-1,3-глюканазы использовали *н*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-[β-(4-метилморфолиний)-этил]карбодимид (ЦМЭЖ) и в качестве амина — метиловый эфир глицина. Реакцию проводили по методике, предложенной Кошландом [15]. После отделения избытка реагентов гель-фильтрацией (см. «Экспериментальную часть») определяли прирост глицина в модифицированном ферменте. Результаты определения аминокислотного состава приведены в табл. 1.

При модификации нативного фермента наблюдалась частичная коагуляция белка. Ранее [16] было обнаружено, что присутствие неионогенного детергента бридж-35 предотвращает коагуляцию белка при pH 8 и выше. Модификация фермента в присутствии бридж-35 (опыт 2, табл. 1) приводит к увеличению числа остатков глицина на 5, что совпадает с данными опыта 1. В условиях этой модификации происходит полное падение ферментативной активности. В присутствии субстрата (опыт 3) модифицируются три карбоксильные группы. Для возможно более полной модификации всех свободных карбоксильных групп в молекуле β-1,3-глюканазы реакцию проводили в 8 М мочеvine и 5 М хлоргидрате гуанидина. В этих условиях (опыт 4, 5, табл. 1) число включенных остатков глицина увели-

чилось до 7—8. Такое невысокое количество модифицируемых карбоксильных групп, возможно, объясняется или высокой степенью амидирования дикарбоновых аминокислот, или недоступностью их из-за стерических препятствий.

Чтобы обнаружить карбоксильные группы, отличающиеся от остальных повышенной реакционной способностью, использовали модификацию  $\beta$ -1,3-глюканазы ЦМЭК и динитрофенилгексаметилендиамином (ДФГА) в мягких условиях. Количество остатков ДФГА, присоединившихся к белку, определяли по возрастанию поглощения модифицированного белка при 360 нм [17]. На рис. 3 приведен УФ-спектр модифицированной  $\beta$ -1,3-глюканазы, где виден характерный пик хромофора при 360 нм.

Оказалось, что включение хромофорной группы в молекулу  $\beta$ -1,3-глюканазы наблюдалось только после предварительного выдерживания белка в растворе бридж-35 не менее суток при 4° (табл. 2). При 270-кратном избытке амина наблюдается зависимость числа модифицированных остатков и соответственно инактивации от количества ЦМЭК, вводимого в реакцию. В отсутствие ЦМЭК (опыт 3) включается ~ 0,5—1 остатка хромофора с сохранением ферментативной активности; при 1000-кратном

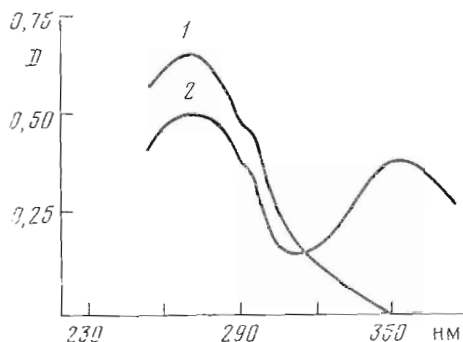


Рис. 3. УФ-спектры  $\beta$ -1,3-глюканазы (1) и  $\beta$ -1,3-глюканазы, модифицированной ДФГА в присутствии ЦМЭК (2)

Таблица 1

Взаимодействие  $\beta$ -1,3-глюканазы с метиловым эфиром глицина в присутствии ЦМЭК

Номер опыта	Условия модификации	Увеличение остатков глицина в ферменте, моль/моль
1	Стандартные условия *	5
2	+0,05% бридж-35	5
3	+0,6% ламинарин	3
4	+8 М мочевины	7
5	+5 М хлоргидрат гуанидина	8

\* 1 мг белка в 1 мл 0,05 М NaCl; 1 М GlyOMe; 0,1 М ЦМЭК; pH 4,75; 3 ч, 20°.

Таблица 2

Взаимодействие  $\beta$ -1,3-глюканазы с ДФГА и ЦМЭК \*

Номер опыта	Бридж-35, %	ЦМЭК, избыток по отношению к ферменту, моль/моль	ДФГА, связанный с ферментом, моль/моль	Активность, %
1	—	2340	Белок коагулировал	0
2	2 **	218	0	100
3	2	—	0,5—1	100
4	2,5	218	1,6	54
5	2	1000	2	40
6	2	2340	2,5	~40

\* Условия реакции: 1—3 мг белка в 1 мл 0,5 М NaCl (pH 5,5), выдерживание в 2% бридж-35 (1 сут при 4°), 270-кратный избыток ДФГА, переменное количество ЦМЭК, 2—3 ч при 20°.

\*\* Бридж-35 добавлен непосредственно перед началом реакции.

молярном избытке ЦМЭК модифицируется до двух карбоксильных групп фермента и сохраняется 40% его активности; при 2340-кратном избытке ЦМЭК — до 2,5 остатков. Определение активности модифицированного фермента в последнем случае можно было провести лишь ориентировочно, так как в условиях модификации в растворе белка появлялась опалесценция.

Действие на  $\beta$ -1,3-глюканазу известного ингибитора пепсина — *N*-диазоацетил-*N'*-2,4-динитрофенилэтилендиамина (ДДЭА) в условиях [18] не привело к заметной потере активности. Включения хромофорной группы в молекулу фермента не наблюдалось.

Таким образом, данные инактивации фермента окисью пропилена и защитного действия субстрата или его аналога в этой реакции позволяют предположить участие карбоксильной группы (или групп) в активном центре фермента. Из результатов взаимодействия фермента с ДФГА (табл. 2) видно, что модификация 1-го остатка (в отсутствие ЦМЭК, опыт 3) вообще не сказывается на активности. Модификация следующих, 2-го и 3-го, остатков в присутствии ЦМЭК (опыты 4—6) соответствовала падению активности до 54 и 40% от исходной. Модификация метиловым эфиром глицина в присутствии ЦМЭК (табл. 1) следующих двух остатков, 4-го и 5-го (если допустить, что первыми в этом случае модифицируются те же самые остатки, что и с ДФГА), вызывает полную инактивацию фермента. Это подтверждается совпадением результатов табл. 1 и 2: присутствие субстрата (опыт 3, табл. 1) предохраняет от модификации именно две карбоксильные группы.

Складывается впечатление, что модифицируемые первыми три карбоксильные группы не входят непосредственно в активный центр фермента, однако они либо важны для фермент-субстратного взаимодействия, либо их блокировка создает пространственные затруднения при образовании фермент-субстратного комплекса. Только модификация 4-й и 5-й группировок инактивирует фермент полностью. Возможно, что именно среди них находится карбоксильная группа активного центра, непосредственно участвующая в катализе.

В пользу высказанного предположения можно привести некоторые литературные данные. Так, при модификации пепсина ДФГА в присутствии ЦМЭК происходит включение одного остатка хромофора на молекулу фермента с сохранением 40% активности. Карбоксильная группа активного центра при этом остается свободной [17]. В лизоциме карбодимидным методом модифицируются все карбоксильные группы, кроме глутаминовой-35, входящей в активный центр фермента. Присутствие субстрата защищает и вторую группу активного центра — аспарагиновую-52. Интересно, что первые две карбоксильные группы в лизоциме модифицируются без какого-либо влияния на активность и лишь модификация третьей вызывает резкое падение ферментативной активности [15, 19].

В нативном кобротоксине этим же методом модифицируется шесть из семи карбоксильных групп с сохранением активности [20]. Она полностью исчезает только при модификации в присутствии хлоргидрата гуанидина седьмой, «погруженной» карбоксильной группы, которая, очевидно, является особо важной для активности токсина.

Таким образом, инактивация  $\beta$ -1,3-глюканазы под действием реагентов, специфически блокирующих карбоксильные группы в белках, позволяет предположить важную роль этих групп для активности фермента.

### Экспериментальная часть

$\beta$ -1,3-Глюканазу IV (1,3-(1,3; 1,4)- $\beta$ -*D*-глюкан-3(4)-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.6) получали из кристаллического стебелька двустворчатого моллюска *S. sachalinensis* [9]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически. Оптическая плотность при 280 нм 0,1% раствора  $\beta$ -1,3-глюканазы составляла 1 ОЕ, *M* 22 000.

Активность фермента определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [21]. Ламинарин получали из бурой водоросли *L. cycharioides* по описанному методу [22].

*Реагенты.* Метилловый эфир глицина синтезировали по методу [23]; ДФГА получали динитрофенилированием избытка гексаметилендиамина и очищали перекристаллизацией из 6 н. HCl; ЦМЭК синтезировали в Институте органической химии СО АН СССР; ДДЭА любезно предоставлен Л. М. Гинопдманом (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР); бридж-35 — препарат фирмы Calbiochem (США).

УФ-спектр фермента снят на двухлучевом спектрофотометре фирмы Shimadzu, MPS-5000 (Япония). Аминокислотный анализ проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе Bюсал-3201 (ЛКВ, Швеция).

*Инактивация  $\beta$ -1,3-глюканазы окисью пропилена.* а) Зависимость от рН (рис. 1). К 0,3 мл раствора фермента (0,27 мг/мл) в 0,05 М NaCl добавляли по 0,1 мл 0,1 М буфера (рН 3,2 и 4,0 — ацетатный; 6,0 — фосфатный) и по 0,05 мл окиси пропилена. Реакцию проводили при комнатной температуре. Периодически отбирали аликвоты по 0,01 мл для определения активности. В контрольных опытах фермент инкубировался в отсутствие окиси пропилена.

б) Влияние окиси пропилена на активность  $\beta$ -1,3-глюканазы при рН 3,2 (рис. 2). Проба № 1 содержала контрольный раствор фермента: 0,3 мг/мл в уксусной кислоте, рН 3,2. Для получения остальных растворов к 0,3 мл пробы № 1 добавляли: в пробу № 2 — 0,01 мл 50% бридж-35; № 3 — 0,1 мл окиси пропилена; № 4 — 0,01 мл 50% бридж-35 + 0,1 мл окиси пропилена; № 5 — 0,01 мл раствора ламинарина (10 мг/мл) или ламинарибиозы (10 мг/мл) + 0,1 мл окиси пропилена. После окончания реакции в каждую пробу добавляли нейтральный раствор гидроксилamina до концентрации 0,1 М. Через 30 мин, 1 и 3 ч отбирали аликвоты на определение активности.

*Реакция  $\beta$ -1,3-глюканазы с метиловым эфиром глицина в присутствии ЦМЭК* проводилась по методике Кошланда [15]. Раствор белка (1 мг/мл) в 0,05 М NaCl, содержащий 0,1 М ЦМЭК и 1 М метиловый эфир глицина, выдерживали 3 ч при комнатной температуре и рН 4,75. Аналогично проводили опыты в присутствии субстрата и детергента (см. табл. 1). Белок, очищенный от избытка реагентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25, подвергали гидролизу 6 н. HCl в течение 24 ч при 105°. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Bюсал-3201. Результаты сравнивали с данными аминокислотного анализа нативного фермента.

*Реакция  $\beta$ -1,3-глюканазы с ДФГА в присутствии ЦМЭК.* К 1 мл раствора фермента (1—3 мг белка) в 0,5 М NaCl (рН 5,5) добавляли бридж-35 (2%) и выдерживали сутки при 4°. Затем добавляли 270-кратный избыток ДФГА в диметилформамиде (2% по объему к раствору фермента) и при перемешивании всыпали ЦМЭК. Смесь выдерживали 2—3 ч при комнатной температуре и постоянном рН, отбирая аликвоты по 0,01 мл для определения ферментативной активности. Избыток реагентов отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Элюцию проводили 0,05 М NaCl. Количество остатков ДФГА, присоединившихся к ферменту, рассчитывали по УФ-спектру, считая  $\epsilon_{360} = 15000$  (см. табл. 2 и рис. 3).

*Реакция  $\beta$ -1,3-глюканазы с ДДЭА* проводилась по описанной методике [18]. К 1 мл фермента (0,8 мг) в ацетатном буфере, рН 5,2, добавляли 0,5 мг  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 1 мг ингибитора в 0,1 мл сухого ацетона. Смесь выдерживали при комнатной температуре, отбирая по 0,01 мл на определение активности. Через 3 ч проводили гель-фильтрацию образца на колонке сефадекса G-25, уравновешенной 0,05 М NaCl.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. (1967) Proc. Roy. Soc., B 167, 378—588.
2. Braun H., Legler G., Deshusser J., Semenza G. (1977) Biochim. et biophys. acta, 483, 135—140.
3. Quaroni A., Semenza G. (1976) J. Biol. Chem., 251, 3250—3253.
4. Braun H. (1976) Biochim. et biophys. acta, 452, 452—457.
5. Shulman M. L., Shiyan S. D., Khorlin A. Ya. (1976) Biochim. et biophys. acta, 445, 169—181.
6. Matyash L. F., Ogloblina O. G., Stephanov V. M. (1973) Eur. J. Biochem., 35, 540—545.
7. Назарова Т. Н., Аваева С. М. (1973) Биохимия, 38, 169—173.
8. Blow D. M., Birkoft J. J., Hartley B. S. (1969) Nature, 221, 337—340.
9. Sova V. V., Elyakova L. A. (1972) Biochim. et biophys. acta, 258, 219—227.
10. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н. (1975) Биоорган. химия, 1, 1470—1473.
11. Thomas E. W., McKelvy J. F., Sharon N. (1969) Nature, 222, 485—486.
12. Quaroni A., Gershon E., Semenza G. (1974) J. Biol. Chem., 249, 6424—6433.
13. Fraenkel-Conrat H. (1944) J. Biol. Chem., 154, 227—238.
14. Pilz W. (1959) Z. analyt. Chem., 166, 189—193.
15. Hoare D. G., Koshland D. E., Jr. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 2057—2059.
16. Елякова Л. А., Улькина Ж. И., Глебоко Л. И. (1977) Биоорган химия, 3, 555—560.
17. Матяш Л. Ф., Оглоблина О. Г., Степанов В. М. (1972) Биохимия, 37, 1067—1073.
18. Желковский А. М., Лисалон У. Р., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Мирошников А. И., Антонов В. К. (1977) Биоорган. химия, 3, 1430—1431.
19. Lin T. Y., Koshland D. E. (1969) J. Biol. Chem., 244, 505—508.
20. Chang C. C., Yang C. C., Nakai K., Hayashi K. (1971) Biochim. et biophys. acta, 251, 334—344.
21. Nelson N. (1944) J. Biol. Chem., 153, 375—381.
22. Black V. A. P. (1969) Methods in Carbohydr. Chemistry, pp. 159—161, Acad. Press, N. Y.—London.
23. Гринштейн Дж., Вишц М. (1965) Химия аминокислот и пептидов, с. 427, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
7.IV.1978

### INFLUENCE OF REAGENTS INTERACTING WITH CARBOXYLIC GROUPS ON $\beta$ -1,3-GLUCANASE FROM *SPISULA SACHALINENSIS*

SOVA V. V., ELYAKOVA L. A.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science  
Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Propylene oxide was found to inhibit irreversibly  $\beta$ -1,3-glucanase at pH values below 7, whereby the substrate (laminarin) protects the enzyme from the inactivation. Chemical modification of  $\beta$ -1,3-glucanase carboxyl groups using glycine methyl ester and water-soluble N-cyclohexyl-N'- $\beta$ -(4-methylmorpholino)-ethyl-carbodiimide *p*-toluenesulphonate resulted in the incorporation of 5 glycyI residues per enzyme molecule and complete inactivation of the enzyme. In 8 M urea or 5 M guanidine hydrochloride the number of modified carboxyl groups constituted 7-8, whereas in the presence of the substrate it fell to 3. Upon enzyme modification by dinitrophenylhexamethylenediamine using Koshland's carbodiimide method, 2-2.5 amine residues were incorporated and 40% of enzymatic activity retained. The results pointed to essential role of carboxyl groups in manifestation of  $\beta$ -1,3-glucanase activity.