



УДК 577.156

БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА ИЗ СЕМЯН ГРЕЧИХИ

*Покровский С. Н., Лабазина Н. Ю., Белозерский М. А.**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Обнаружено, что белковый ингибитор химотрипсина, выделенный из семян гречихи, обладает способностью подавлять активность тиловой протеиназы из тех же семян. Метод выделения ингибитора включает в себя экстракцию муки семян водой, фракционирование сульфатом аммония, изоэлектрическое осаждение, гель-фильтрацию через сефадекс G-75, ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе и изоэлектрическое фокусирование. По данным электрофореза в полиакриламидном геле, полученный препарат содержит ~ 5% примеси. Выделенный ингибитор имеет $M \sim 10\ 000$ (по данным фракционирования гель-фильтрацией) и изоэлектрическую точку при pH 4,9. Ингибитор подавляет протеолитическую активность химотрипсина и трипсина и не подавляет активность гидролазы, расщепляющей N^α -бензоил-*D,L*-аргинил-*n*-нитро-анилид, из семян гречихи. Двумя методами (по расщеплению казеина и по створаживанию молока) показано, что выделенный ингибитор снижает протеолитическую активность тиловой протеиназы семян гречихи. Высказано предположение, что выделенный ингибитор регулирует активность этой протеиназы.

Природные ингибиторы протеолитических ферментов широко распространены в растениях [1—3]. Однако они, как правило, подавляют активность протеиназ животных и микроорганизмов. Действие этих белковых ингибиторов на собственные протеиназы растений исследовано мало. В этом направлении имеется лишь несколько работ [4—11], проведенных на экстрактах семян, поэтому полученные данные трудно интерпретировать однозначно. Дальнейшие исследования таких ингибиторов растительного происхождения представляют интерес для понимания их физиологической роли в семенах растений.

В настоящем сообщении приводятся данные о выделении из семян гречихи белкового ингибитора, способного подавлять активность тиловой протеиназы тех же семян, и его свойствах. Для выделения ингибитора нами был разработан следующий метод. Покоящиеся семена гречихи измельчали на мельнице, муку семян экстрагировали дистиллированной водой (в отношении 1 : 3) при 4° в течение 12 ч, экстракт отделяли центрифугированием (23 000 *g*, 20 мин). За активностью ингибитора в процессе выделения следили по подавлению им протеолитической активности химотрипсина. Последнюю определяли по методу Ансона [12], используя казеин в качестве субстрата. Белок из экстракта осаждали сульфатом аммония (0,8 насыщения при 4°) и центрифугировали (23 000 *g*, 30 мин). Осадок растворяли в дистиллированной воде, pH 5,8, и подвергали изоэлектрическому осаждению путем диализа против 0,05 М цитратно-фосфатного буфера, pH 4,9, в течение 12 ч при 4°. Образовавшийся осадок центрифугировали (23 000 *g*, 10 мин) и растворяли в 0,05 М фосфатном

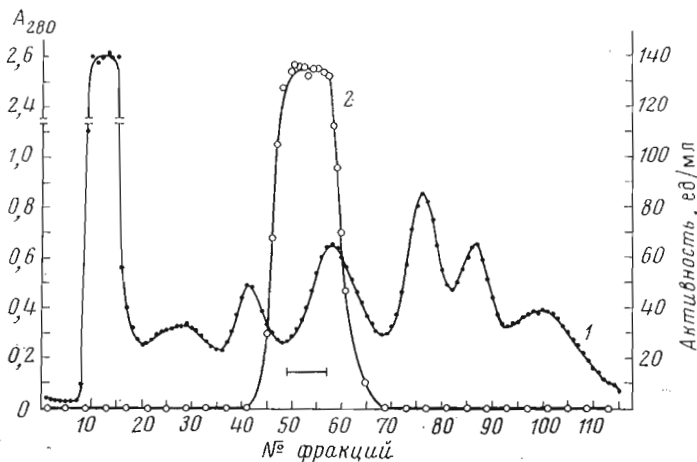


Рис. 1

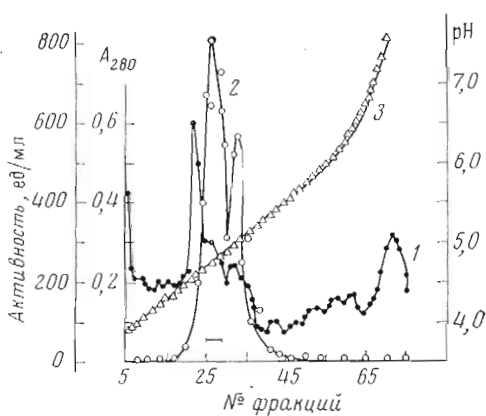


Рис. 2

Рис. 1. Гель-фильтрация препарата ингибитора через сефадекс G-75. 1 — оптическая плотность при 280 нм, 2 — активность ингибитора по химотрипсину

Рис. 2. Изоэлектрическое фокусирование препарата ингибитора в градиенте pH 4—6. 1 — оптическая плотность при 280 нм, 2 — активность ингибитора по химотрипсину, 3 — pH

буфере, pH 6,5. Полученный препарат наносили на колонку (3,5 × 170 см) с сефадексом G-75, уравновешенную 0,05 M фосфатным буфером, pH 6,5, содержащим 0,02 % азида натрия. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 40 мл/ч и собирали фракции объемом 8 мл. Результаты гель-фильтрации представлены на рис. 1. Фракции, обладающие максимальной ингибирующей активностью (на рис. 1 отмечены горизонтальной чертой), объединяли, концентрировали и использовали для дальнейшей очистки. Препарат ингибитора после гель-хроматографии наносили на колонку (1 × 25 см) с DEAE-сефадексом A-25, уравновешенную 0,05 M фосфатным буфером, pH 6,5. Фракцию, не сорбированную в данных условиях на ионообменнике, концентрировали и обессоливали на колонке (2,2 × 30 см) с сефадексом G-25, уравновешенной дистиллированной водой, скорость элюции 20 мл/ч. Обессоленный препарат подвергали изоэлектрическому фокусированию [13] в линейном градиенте pH от 4 до 6 в течение 48 ч при 4°. Результаты опыта представлены на рис. 2. Наиболее активные фракции, соответствующие большому пику активности (на рис. 2 отмечены горизонтальной чертой), объединяли и диализовали против 0,05 M фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 0,02 % азида натрия. Изоэлектрическая точка выделенного белкового ингибитора соответствует pH 4,9. Электрофореграмма полученного препарата представлена на рис. 3, а характеристика отдельных стадий очистки ингибитора — в табл. 1. Количество примеси в изучаемом препарате по данным электрофореза в полиакриламидном геле ~ 5%.

Следующим этапом нашей работы было изучение ряда физико-химических и биохимических свойств полученного препарата.

Определение молекулярного веса ингибитора проводили методом гель-фильтрации [14] через колонку (1,6 × 80 см) с сефадексом G-50, уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером, рН 6,5. Ввиду того что на последних стадиях очистки мы получали мало препарата, в опытах по определению молекулярного веса ингибитора использовали препарат после гель-фильтрации через сефадекс G-75. Выход ингибитора с колонки определяли по элюции пика активности. В качестве белковых маркеров использовали соевый ингибитор трипсина Кунитца (M 21 500), миоглобин (M 17 000) и цитохром *c* (M 13 000). На колонку наносили по 0,5 мл 2% раствора белка в 0,05 М фосфатном буфере, рН 6,5, скорость элюции 9 мл/ч. Свободный объем колонки (V_0) находили по объему выхода голубого декстрана (Pharmacia, Швеция, M 2·10⁶), а объем выхода белка с колонки (V_c) определяли как объем элюата, вышедшего с момента нанесения на нее белка до появления фракции с максимальной концентрацией. Молекулярный вес ингибитора, определенный методом графической экстраполяции, оказался равным ~ 10 000 (рис. 4).

Выделенный белковый ингибитор эффективно подавлял протеолитическую активность химотрипсина (рис. 5), несколько хуже — активность трипсина и не подавлял активность гидролазы, расщепляющей N^{α} -бензойл-*D*, *L*-аргинин-*n*-нитроанилид семян гречихи — фермента, известного в литературе, не гидролизующего казеин, гемоглобин и собственные белки семян [15]. Функциональная роль этого фермента в настоящее время неизвестна.

Мы изучили действие ингибитора на тиоловую протеиназу семян гречихи [16]. Препарат этой протеиназы получали по описанному ранее методу [17], включающему фракционирование экстракта ацетоном и сульфатом аммония, хроматографию на СМ-сефадексе С-50. Вместо стадии диализа и изоэлектрического фокусирования была использована гель-фильтрация через сефадекс G-100.

Протеолитическую активность тиоловой протеиназы определяли двумя методами: по створаживанию молока [18] и по модифицированному методу Ансона [12]. Результаты опытов суммированы в табл. 2.



Рис. 3. Электрофореграмма препарата ингибитора, полученного после изоэлектрического фокусирования (15% полиакриламидный гель)

Таблица 1
Стадии очистки ингибитора

Стадия	Белок, мг в 1 л экстракта	Активность, ед/л	Удельная активность, ед/мг	Выход по активности, %	Степень очистки
Экстракция	5500,0	350 000	63,6	100,0	1,0
Изоэлектрическое осаждение (рН 4,9)	250,0	50 250	201,0	14,3	3,1
Гель-фильтрация через сефадекс G-75	22,0	42 500	1931,8	12,1	30,0
Хроматография на DEAE-сефадексе	8,3	35 703	4301,5	10,2	67,6
Изоэлектрическое фокусирование	1,2	22 000	18 333,3	6,2	288,2

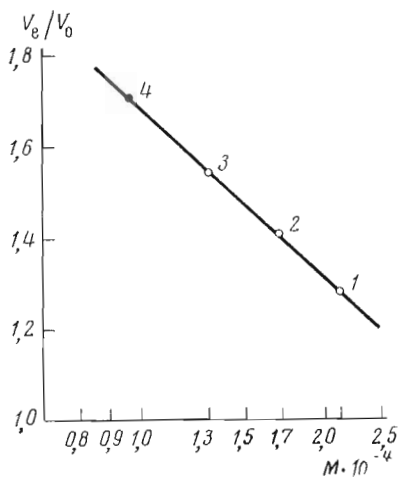


Рис. 4

Рис. 4. Графическое определение молекулярного веса ингибитора методом колоночной гель-фильтрации через сефадекс G-50. 1 — соевый ингибитор Кунитца, 2 — миоглобин, 3 — цитохром с, 4 — исследуемый ингибитор

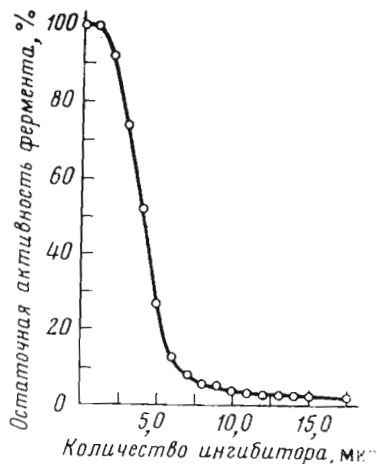


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость протеолитической активности химотрипсина от количества ингибитора в пробе

Как видно из табл. 2, выделенный препарат тиоловой протеиназы обладал способностью створаживать молоко и расщеплять казеин. В присутствии ингибитора время створаживания молока значительно увеличилось, а степень гидролиза казеина сильно снижалась, что говорит о резком уменьшении активности тиоловой протеиназы. Остальные смеси использовали в качестве контролей на неспецифическое ингибирование, на наличие в препарате фермента протеолитической активности, не активируемой цистеином, и на препараты субстрата и активатора. Мы не определяли степень ингибирования тиоловой протеиназы на всех стадиях очистки ингибитора ввиду отсутствия у нас препарата фермента в препаративных количествах. Однако нами установлено, что препарат ингибитора, полученный после ионообменной хроматографии (см. табл. 1), был в 3—4 раза менее активным при ингибировании гидролиза казеина тиоловой протеиназой, чем конечный препарат ингибитора после изоэлектрического фокусирования. Это хорошо согласуется с данными по изучению степени ингибирования химотрипсина препаратом ингибитора, находящимся на тех же стадиях очистки (см. табл. 1).

Таблица 2

Изучение действия ингибитора химотрипсина из семян гречихи на тиоловую протеиназу тех же семян

Состав инкубационной смеси	Время створаживания	Степень гидролиза казеина в ед. оптической плотности при 750 нм
Фермент + активатор + субстрат	15 мин	0,25
Фермент + ингибитор + активатор + субстрат	>2 ч	0,07
Фермент + соевый ингибитор трипсина Кунитца (100 мкг) + активатор + субстрат	16 мин	0,23
Фермент + 0,02% азиды натрия + активатор + субстрат	15 мин	0,25
Фермент + 1% амфолины + активатор + субстрат	15 мин	0,25
Фермент + субстрат	>10 ч	0,00
Субстрат	>10 ч	0,00
Субстрат + активатор	>10 ч	0,01

Таким образом, показано, что в семенах гречихи содержится ингибитор белковой природы, способный подавлять гидролиз казеина и створаживание молока тиоловой протеиназой из тех же семян. Этот факт позволяет думать о том, что белковые ингибиторы семян выспых растений могут участвовать в регуляции активности собственных протеиназ.

Экспериментальная часть

Для выделения ингибитора, тиоловой протеиназы и гидролазы N^{α} -бензоил-*D,L*-аргинин-*n*-нитроанилида использовали покоящиеся семена гречихи (*Fagopyrum esculentum Moench*) сорта «Большевик», урожая 1975 г.

Концентрацию белка в растворе определяли по методу Лоури [19], используя в качестве стандарта препарат бычьего сывороточного альбумина, а также оценивали по величине оптической плотности при 280 нм. Величину оптической плотности регистрировали с помощью спектрофотометра СДФ-2.

Активность α -химотрипсина (Reanal, Венгрия) определяли по методу Ансона [12], используя в качестве субстрата казеин (Reanal, Венгрия). (Отсутствие в исследуемом препарате α -химотрипсина примеси трипсина устанавливали по его неспособности расщеплять N^{α} -бензоил-*D,L*-аргинин-*n*-нитроанилид.) Готовили 1% раствор казеина в 0,1 М Трис-НСl-буфере, рН 8,0, который подвергали денатурации кипячением в течение 1 ч. Реакцию проводили следующим образом: к 0,1 мл раствора фермента в 10^{-3} НСl, содержащего 10 мкг фермента, приливали 1 мл 1% раствора казеина, смесь инкубировали 30 мин при 37°, а затем прибавляли к ней равный объем 10% раствора трихлоруксусной кислоты, осадок отделяли центрифугированием (3000 г, 10 мин), а в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при 280 нм. Измерения проводили против контроля, который готовили аналогичным образом, исключая инкубацию фермента с субстратом.

Активность ингибитора определяли по его способности подавлять протеолитическую активность химотрипсина. Реакцию проводили, прибавляя к 0,1 мл раствора химотрипсина (10 мкг) 0,1 мл исследуемого раствора, смесь инкубировали 10 мин при 37°. Далее в инкубационной смеси определяли активность химотрипсина по методу, описанному выше. Полученные результаты сравнивали с контролем на активность фермента, который отличался от опыта тем, что в него вместо 0,1 мл исследуемого раствора прибавляли 0,1 мл 0,05 М фосфатного буфера, рН 6,5.

За условную единицу активности ингибитора мы приняли такую его активность, которая снижала активность химотрипсина на 0,1 ед. оптической плотности при 280 нм в указанных выше условиях определения активности химотрипсина.

Активность тиоловой протеиназы семян гречихи определяли по методу Ансона [12], используя в качестве субстрата 1% раствор казеина (Reanal, Венгрия) в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере, рН 6,8, и по методу створаживания молока [18]. Цельное молоко обезжиривали путем центрифугирования (23 000 г, 60 мин, 4°) и лиофильно высушивали. В качестве субстрата использовали 0,2% раствор сухого молока в 0,05 М имидазольном буфере, рН 6,5, содержащем 10 мМ CaCl₂. Реакцию проводили следующим образом: к 0,1 мл раствора фермента (5 мкг) в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере, рН 6,8, прибавляли 0,2 мл раствора ингибитора (20 мкг) в 0,05 М фосфатном буфере, рН 6,5, инкубировали 30 мин при 37°, затем для активации фермента к смеси прибавляли 0,05 мл раствора цистеина (500 мкг) в 1 М цитратно-фосфатном буфере, рН 6,4, смесь инкубировали 10 мин при 37° и прибавляли к ней 2 мл раствора субстрата. Об активности тиоловой протеиназы судили по времени створаживания молока, которое определяли визуально. При определении активности

по методу Ансона в качестве субстрата использовали 1% раствор казеина в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере, рН 6,8. Опыты проводили следующим образом. Фермент активировали цистеином (конечная концентрация активатора в инкубационной смеси $5 \cdot 10^{-3}$ М), а затем удаляли активатор путем обессоливания на колонке с сефадексом G-25. К препарату активированного фермента (30 мкг) добавляли ингибитор (80 мкг), инкубировали 30 мин при 37° и прибавляли 0,3 мл раствора субстрата, смесь инкубировали 60 мин при 37°, добавляли к ней равный объем 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием и в надосадочной жидкости измеряли спектрофотометрически по методу Лоури [19] количество продуктов ферментативного гидролиза.

Определение активности гидролазы N^{α} -бензоил-*D*, *L*-аргинин-*p*-нитроанилида из семян гречихи и трипсина (Calbiochem, США) проводили по методу Эрлангера [20], используя в качестве субстрата $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор *p*-нитроанилида N^{α} -бензоил-*D*, *L*-аргинина в 0,5 М калий-натрий-фосфатном буфере, рН 7,5. К 0,1 мл раствора фермента (10 мкг) прибавляли 2 мл раствора субстрата, смесь инкубировали при 37° в течение 30—60 мин и в инкубационной смеси измеряли оптическую плотность при 410 нм против используемого в опыте раствора субстрата.

Изоэлектрическое фокусирование проводили по методу Хагленда [13] в колонке типа LKB-8100 объемом 110 мл.

Электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли по методу Дэвиса [21] в 10 и 15% геле полиакриламида. Время электрофореза 40—60 мин при напряжении 700 В и силе тока 5 мА на трубку. Столбики геля вынимали и окрашивали 0,04% раствором Кумасси G-250 в 3,5% хлорной кислоте в течение 24 ч при 37° [22].

Степень чистоты выделенного препарата определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для этого предварительно мы выяснили, при какой нагрузке на гель количество связавшегося с белком красителя пропорционально количеству белка, нанесенного на гель. Гели с различными количествами белка окрашивали и сканировали. Сканирование гелей проводили на регистрирующем спектрофотометре «Gilford», США (λ 580 нм, щель 0,05, шкала 1 : 1).

Ультрафильтрацию препаратов проводили в ячейке для концентрирования через мембрану типа UM-10 (Amicon, Голландия) при 4°, в атмосфере азота и давлении 3 атм.

*Авторы благодарны проф. В. О. Шпикитеру за интерес к настоящей работе и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ryan C. A. (1973) *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **24**, 173—196.
2. Мосолов В. В. (1975) в сб. *Растительные белки и их биосинтез* (под ред. Кретовича В. Л.), с. 172—184, М., «Наука».
3. Richardson M. (1977) *Phytochemistry*, **16**, 159—169.
4. Shain Y., Mayer A. M. (1965) *Physiol. Plantarum*, **18**, 853—859.
5. Shain Y., Mayer A. M. (1968) *Phytochemistry*, **7**, 1491—1498.
6. Burger W. C., Siegelman H. W. (1966) *Physiol. Plantarum*, **19**, 1089—1093.
7. Polanowski A. (1967) *Acta biochim. pol.*, **14**, 389—395.
8. Kirsí M., Mikola J. (1971) *Planta*, **96**, 281—291.
9. Warchalewski J. R., Skupin J. (1973) *J. Sci. Food and Agr.*, **24**, 995—1009.
10. Royer A., Miede M. N., Grange A., Miede J., Maschrpa J. M. (1974) *Planta*, **119**, 1—16.
11. Baumgartner B., Chrispeels M. J. (1976) *Plant Physiol.*, **58**, 1—6.
12. Anson M. L. (1938) *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79—89.
13. Hugland H. (1967) *Science Tools*, **14**, 17—23.
14. Andrews P. (1965) *Biochem. J.*, **96**, 595—605.
15. Емцева И. Б., Белозерский М. А. (1977) *Биохимия*, **42**, 726—733.
16. Иордан А. Г., Белозерский М. А. (1975) *Вестн. Моск. ун-та*, **5**, 115—117.
17. Иордан А. Г., Белозерский М. А. (1976) *Биохимия*, **41**, 673—678.
18. Kassel B., Meitner P. A. (1970) *Methods in Enzymol.*, **19**, 337—347.

19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
20. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen N. (1961) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **95**, 271—278.
21. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
22. Reisner A. H., Nemes P., Bucholz C. (1975) *Anal. Biochem.*, **64**, 509—516.

Поступила в редакцию
29.VI.1977

После доработки
10.VIII.1977

CHYMOTRYPSIN INHIBITOR FROM BUCKWHEAT SEEDS

POKROVSKY S. N., LABASINA N. Yu., BELOZERSKY M. A.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

It was found that a chymotrypsin inhibitor isolated from the buckwheat seeds decreased the activity of a thiol proteinase from the same seeds. The isolation procedure consisted of extraction of the seed flour with water, ammonium sulfate fractionation, isoelectric precipitation, Sephadex G-75 gel chromatography, ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25 and isoelectric focusing. The isolated inhibitor was 95% pure according to polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the inhibitor estimated by gel filtration was 10 000 and isoelectric point pI 4.9. The inhibitor was active towards chymotrypsin and trypsin but failed to inhibit N^α -benzoyl-*D,L*-arginine-*p*-nitroanilidase from buckwheat seeds. It was suggested that the inhibitor can function as a regulator of the activity of the thiol proteinase in buckwheat seeds.
