



УДК 577.152.324*6'134

АКТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ ЭНДО- β -1,3-ГЛЮКАНАЗ ИЗ *SPISULA SACHALINENSIS* И *CHLAMYS ALBIDUS*

Назарова Н. И., Мазур А. К., Елякова Л. А.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток

Субстратсвязывающие подцентры эндо- β -1,3-глюканаза из кристаллического стебелыка морских двустворок *Spisula sachalinensis* (ЛIV) и *Chlamys albidus* (Л₀) исследовали с использованием гомологической серии ламинариолигосахаридов (n 2–6), «меченных» по восстанавливающему концу n -нитрофенильным радикалом. ВЭЖХ продуктов начальной стадии реакции ферментативного гидролиза позволила определить частоты расщепления связей субстратов. В соответствии с субсайтной теорией, предложенной Тома, были определены энергии связывания активных центров ЛIV и Л₀, т. е. получены субсайтные карты активных центров ферментов.

Многие аспекты специфичности и механизма действия эндо- β -1,3-глюканаза (КФ 3.2.1.6), выделенных из морских двустворок *Spisula sachalinensis* (ЛIV) и *Chlamys albidus* (Л₀) уже установлены [1–4]. Ранее делались попытки оценить величину активных центров исследуемых ферментов, исходя из их гидролитического действия на β -1,3-глюкан (ламинарии, степень полимеризации n 30) и его короткие аналоги [5–7].

В данной работе мы использовали серию гомологичных ламинариолигосахаридов в виде их n -нитрофенилгликозидов. Они служат удобными субстратами для детального исследования механизма действия и характеристики активных центров ферментов, в том числе для составления их субсайтных карт, так как наличие арильной группы позволяет легко тестировать образующиеся при ферментативном гидролизе продукты по УФ-поглощению.

В соответствии с методом Тома [8], основанным на предположении, что каждый субстрат может давать с активным центром фермента ряд непродуктивных и продуктивных комплексов (рис. 1), получение тех или иных продуктов связано с образованием определенного продуктивного комплекса, а количество образующихся продуктов должно отражать частоту осуществления способа связывания. Следовательно, количественный анализ продуктов реакции может дать информацию о числе участков связывания, эффективности взаимодействия мономерных остатков субстрата с отдельными участками активного центра и расположении каталитического участка.

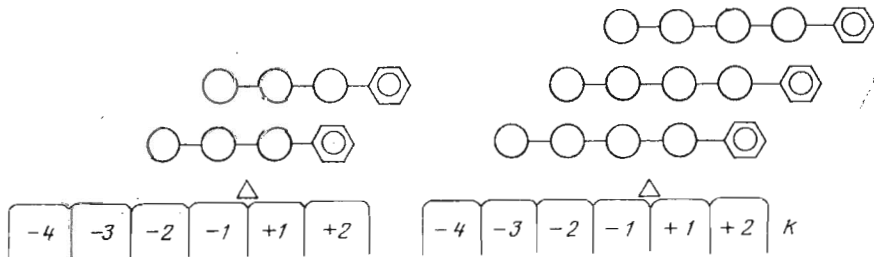


Рис. 1. Схема взаимодействия n -нитрофенилгликозидов с активным центром ламинариназы (в соответствии с методом [8]) -1 – -4 –гликоновые подцентры, $+1$, $+2$ –агликоновые подцентры. Треугольником обозначен каталитический участок, кружка — β -1,3-связанные остатки глюкозы; — n -нитрофенил.

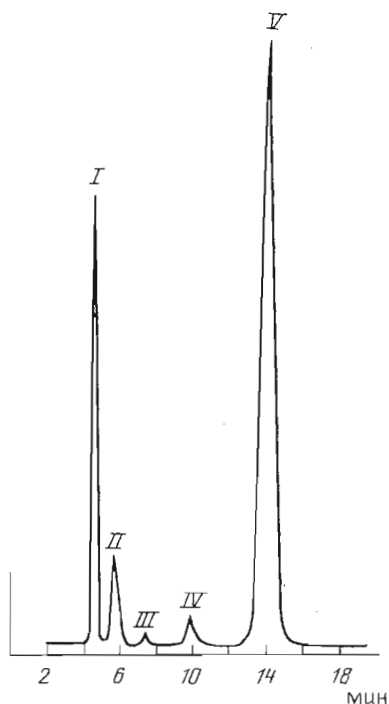


Рис. 2

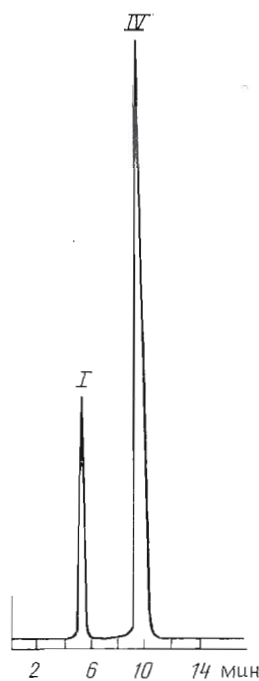


Рис. 3

Рис. 2. Разделение продуктов гидролиза эндо- β -1,3-глюканазой Л1V (30 мин) *p*-нитрофенилпентаозид (V) ВЭЖХ (см. «Экспер. часть»), I-V — *p*-нитрофенилглюкозид, -биоид, -триозид, -тетраозид, -пентаозид соответственно

Рис. 3. Разделение продуктов гидролиза эндо- β -1,3-глюканазой Л0 (15 мин) *p*-нитрофенилтетраозид (IV). Обозначения как на рис. 2

Для расчета сродства отдельных участков связывания достаточно провести количественный анализ продуктов ферментативного гидролиза ряда линейных субстратов с меченым восстанавливающим концом.

Индивидуальные *p*-нитрофенилламинариполигозиды с *n* 2–6 были подвергнуты ферментативному гидролизу ламинариназами Л1V и Л0. С помощью ВЭЖХ анализировали продукты реакции на начальных стадиях гидролиза (рис. 2, 3).

Количественный анализ продуктов позволил получить картину частот расщепления гликозидных связей в линейных субстратах (рис. 4).

В соответствии с методом Тома [8] относительные частоты разрыва связей в олигосахаридах связываются с подцентральной структурой области связывания фермента соотношением

$$-RT \ln \frac{P_{n,i}}{P_{n,i+1}} = \Delta G_{n,i} - \Delta G_{n,i+1}, \quad (1)$$

где $P_{n,i}$ — относительная частота расщепления *i*-й связи в *n*-мере, $\Delta G_{n,i}$ — свободная энергия ассоциации соответствующего E-S-комплекса. Если A_k — энергия взаимодействия глюкозного остатка субстрата в подцентре фермента с номером *k*, то для гомогенного олигосахарида

$$\Delta G_{n,i} = \sum_{k=-n+i}^i A_k, \quad (2)$$

где использована нумерация подцентров как на рис. 1, а связи в олигосахаридах нумеруются, начиная с восстанавливающего конца. Подстановка (2) в (1) дает формулу

$$-RT \ln \frac{P_{n,i}}{P_{n,i+1}} = A_{-n+i} - A_{i+1}, \quad (3)$$

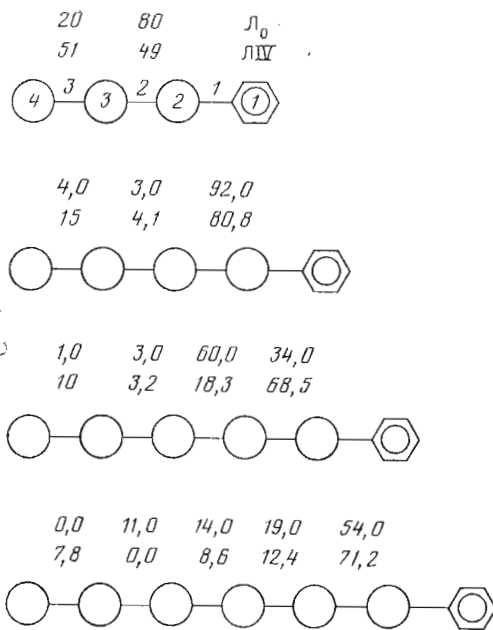


Рис. 4. Частота расщепления β -1,3-связей (%) в n -нитрофенилполигозидах под действием ЛПВ (нижний ряд цифр) и Λ_0 (верхний ряд цифр). Обозначения как на рис. 1

которая позволяет оценить величины A_k в стандартной процедуре Тома [8]. Для олигосахаридов, меченных n -нитрофенильным радикалом (Np), необходимо учесть влияние метки. Вводя энергию взаимодействия Np в подцентрах A_k^{Np} аналогично (1)–(3), получим

$$-RT \ln \frac{P_{n,i}}{P_{n,i+1}} = A_{-n+i} + A_i^{Np} - A_i - A_{i+1}^{Np}. \quad (4)$$

Подставляя в формулу (4) приведенные на рис. 4 экспериментальные данные, получим следующие значения энергии (в кДж/моль):

$$-RT \ln \frac{0,49}{0,51} = A_{-2} + A_2^{Np} - A_2 - A_3^{Np} = +0,098, \quad (5)$$

$$-RT \ln \frac{0,041}{0,15} = A_{-2} + A_3^{Np} - A_3 - A_4^{Np} = +3,18, \quad (6)$$

$$-RT \ln \frac{0,808}{0,041} = A_{-3} + A_2^{Np} - A_2 - A_3^{Np} = -7,31, \quad (7)$$

$$-RT \ln \frac{0,183}{0,032} = A_{-3} + A_3^{Np} - A_3 - A_4^{Np} = -4,28, \quad (8)$$

$$-RT \ln \frac{0,124}{0,086} = A_{-4} + A_3^{Np} - A_3 - A_4^{Np} = -0,90, \quad (9)$$

$$-RT \ln \frac{0,712}{0,124} = A_{-5} + A_2^{Np} - A_2 - A_3^{Np} = -4,29, \quad (10)$$

$$-RT \ln \frac{0,685}{0,183} = A_{-1} + A_2^{Np} - A_2 - A_3^{Np} = -3,22 \quad (11)$$

и т. д.

Получив такие уравнения для ряда олигомеров, нетрудно заметить, что в некоторых случаях энергии A_i^{Np} входят в них в одинаковых комбинациях (ср. 6 и 8) и поэтому их можно исключить, получив истинную разность энергий сорбции гликозидных остатков в подцентрах. Такие

Величины энергий взаимодействия подцентров (A_k) активных центров глюконаз ЛІV из *S. sachalinensis* и Л₀ из *Ch. albidus*

Подцентры	Номер подцентра, k	A_k , кДж/моль	
		ЛІV	Л ₀
Гликоновые	-5	-1,38	0,00
	-4	-0,32	+3,84
	-3	-4,40	-5,42
	-2	+3,0	-0,95
	-1	-24,0 *	-
+1			
Агликоновые	+2	+2,90	+2,49

* Данные работы [5].

разности (в кДж/моль) можно получить для всех подцентров гликоновой (левой) части активного центра:

$$A_{-2} - A_{-3} = 7,40 \quad [(5) - (7)], \quad (12)$$

$$A_{-3} - A_{-4} = -4,08 \quad [(7) - (11)], \quad (13)$$

$$A_{-2} - A_{-3} = +7,46 \quad [(6) - (8)], \quad (14)$$

$$A_{-4} - A_{-5} = +1,06 \quad [(11) - (10)], \quad (15)$$

$$A_{-3} - A_{-4} = -3,38 \quad [(8) - (9)]. \quad (16)$$

Обычная процедура вычисления абсолютных значений энергий A_k из разностных соотношений вида (12)–(16) основана на том, что за пределами области связывания значения энергий для воображаемых подцентров должны быть малы и, следовательно, близки друг к другу. Из соотношений (12)–(16) видно, что разница между A_{-4} и A_{-5} значительно меньше остальных. Кроме того, применение метода Тома [8] к α -амилазам показало, что колебания в энергии для виртуальных подцентров обычно составляют ~ 300 кал/моль, что больше, чем $A_{-4} - A_{-5}$. Поэтому мы положили $A_{-5} = 0$, вычислив таким образом значения A_{-1}, \dots, A_{-4} , приведенные в таблице.

В агликоновой части активного центра от влияния «метки» освободиться нельзя, необходимо ввести какие-то предположения о характере взаимодействия n -нитрофенильного радикала с участками сорбции. Наиболее разумно предположить, что «метка» взаимодействует неспецифически, т. е. одинаково со всеми подцентрами. В этом случае энергии A_k^{NP} взаимно исключаются, и карта агликоновой части активного центра фермента может быть также установлена. Аналогично были рассчитаны энергии связывания для Л₀ (см. таблицу, рис. 5). Следует отметить, что Glc₄-ONp был единственным субстратом для Л₀, который давал только один меченый продукт Glc-ONp (рис. 3). Эта особенность наблюдалась также и на более глубоких стадиях гидролиза.

Данные, представленные в таблице, находятся в хорошем соответствии с данными, полученными другим методом [9], где A_k подцентров агликоновой части активных центров исследуемых ферментов были определены с использованием в качестве субстрата радиоактивно меченного ламинарина.

Результаты показывают, что активные центры исследуемых ферментов обладают «барьерными» участками (подцентрами с положительными значениями A_k), неблагоприятными для связывания мономерной единицы субстрата. Наличие «барьерных» подцентров, предполагаемое нами ранее для глюконаз ЛІV и Л₀ [6], характерно также для некоторых амилаз [10–12].

Характерное для эндоферментов связывание субстратов в гликоновой части не противоречит нашим данным. Согласно рис. 5, значительной по

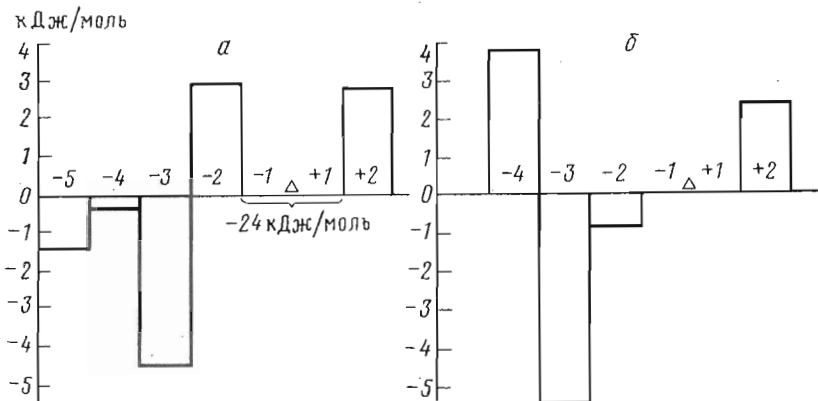


Рис. 5. Гистограмма энергий взаимодействия подцентров активного центра Л1V (а) и Л₀ (б) с глюкозными единицами линейных *n*-нитро-фенилолигосахаридов. Обозначения как на рис. 1. Пояснения в тексте

сравнению с другими подцентрами активного центра сорбционной энергией обладают гликоновые участки -3 , но расположение их относительно «барьерных» подцентров различно. Как видно из таблицы, полученные значения энергий связывания в подцентрах малы по сравнению, например, с активными центрами амилаз [10–12].

К сожалению, используемый метод не может быть применен для определения энергий связывания двух подцентров, соседних с каталитическими группами (участки -1 и $+1$). Однако их общая энергия связывания была рассчитана ранее [5] на основании действия фермента Л1V на ламинарибозу и ламинаритриозу и оказалась равной $-5,8$ ккал/моль (-24 кДж/моль). Если принять средство каталитического участка -1 для Л1V по аналогии с другими эндогликаназами (лизозим [13]) положительным, то средство первого гликонового участка $+1$ должно характеризоваться большой отрицательной величиной, в продуктивных комплексах. По-видимому, рядом с каталитическим участком в агликоновой области активного центра расположен участок, обладающий наибольшей сорбционной способностью (участок $+1$). Такое необычное строение активных центров изучаемых эндоламинариаз, возможно, связано с их особенностями: наряду с разрывами связей во внутренней области молекулы ламинарина ($\sim 50\%$) значительна также частота разрыва связей вблизи восстанавливающего конца субстрата, что проявляется в накоплении большого количества глюкозы, образующейся при ферментативном гидролизе ламинарина. Этому должно способствовать наличие «барьерных» участков $+2$ в агликоновой части активного центра обоих ферментов и множественность атаки, осуществляемой Л1V [9]. Известно, что в составе пищеварительных ферментов большинства организмов содержатся наборы как эндо-, так и экзоэнзимов (α - и β -амилазы, эндо- и экзоцеллюлазы и т. д.), которые катализируют превращение полисахаридов до глюкозы. Возможно, описываемое нами строение активных центров ферментов определяется отсутствием экзогликаназ в кристаллических стебелях морских моллюсков [14].

Экспериментальная часть

Ферменты. Гомогенные эндо- β -1,3-глюканазы были получены из кристаллического стебелька морских моллюсков *Spisula sachalinensis* (Л1V) и *Chlamys albidus* (Л₀), как описано в работах [1–3]. Реакцию ферментативного гидролиза проводили при оптимальных условиях: 0,05 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0 (Л1V), и 0,05 М Na-ацетатный буфер в 0,1 М NaCl, pH 4,5 (Л₀). Время гидролиза 15–30 мин. Глубина гидролиза не превышала 20%. Реакцию останавливали избытком ацетонитрила.

Субстраты. Гомологическая серия *n*-нитрофенилламинариполигосахаридов была получена инкубированием *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (акцентор) и ламинарина- β -1,3-глюкана (донор) из бурой водоросли *L. cycharioides* в присутствии ламинариназы из *S. sachalinensis*, как описано ранее в работе [15]. Продукты ферментатив-

ного синтеза разделяли на колонке (130×1,6 см) с биогелем P-2 (-400 меш). Элюцию проводили дистиллированной водой со скоростью 18 мл/ч. Получали хроматографически чистые индивидуальные *n*-нитрофенилламинариологиды, меченные по восстановливающему концу *n*-нитрофенильным радикалом, которые определяли спектрофотометрически с помощью системы «Uvicord S» при 280 нм.

ВЭЖХ-анализ продуктов ферментативного гидролиза проводили на жидкостном хроматографе Du Pont серии 8800, используя колонку (4×250 мм) Partisil Pac (Altech). Скорость элюции 1 мл/мин. Элюирующая система: ацетонитрил-2,5 мМ Na-ацетатный буфер, pH 4,0-4,3 (80:20). УФ-детектор регистрировал *n*-нитрофениллогиды при 300 нм.

Авторы благодарят М. А. Членова за помощь в проведении ВЭЖХ-анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 212, № 1, p. 111-115.
2. Privalova N. M., Elyakova L. A. Comp. Biochem. and Physiol., 1978, v. 60B, № 3, p. 225-228.
3. Sova V. V., Elyakova L. A. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 258, № 1, p. 219-227.
4. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 680-685.
5. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Привалова Н. М. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1553-1559.
6. Елякова Л. А., Мазур А. К. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, вып. 3, с. 499-510.
7. Мазур А. К., Елякова Л. А. Молекулярн. биология, 1983, т. 17, вып. 1, с. 101-111.
8. Thoma J. A., Brothers A., Spradlin J. Biochemistry, 1970, v. 9, № 8, p. 1768-1775.
9. Bezukladnikov P. V., Elyakova L. A. Carbohydr. Res., 1986, in press.
10. Shuganuma T., Matsuno R., Ohnishi M., Hiromi K. J. Biochem., 1978, v. 84, № 2, p. 293-316.
11. Kondo H., Nakatani H., Hiromi K., Matsuno R. J. Biochem., 1978, v. 84, № 2, p. 403-417.
12. Iwasa S., Nakatani H., Hiromi K., Natano H. J. Biochem., 1974, v. 75, № 5, p. 969-978.
13. Chipman D. M., Sharon N. Science, 1969, v. 164, № 3892, p. 454-465.
14. Elyakova L. A., Shilova T. G. Comp. Biochem. and Physiol., 1979, v. 64B, № 3, p. 245-248.
15. Назарова Н. И., Елякова Л. А. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1189-1196.

Поступила в редакцию
3.II.1986

ACTIVE SITES OF THE ENDO- β -1,3-GLUCANASES FROM *SPISULA SACHALINENSIS* AND *CHLAMYDYS ALBIDUS*

NAZAROVA N. I., MAZUR A. K., ELYAKOVA L. A.

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

The substrate binding sites of the endo- β -1,3-glucanases from crystalline style of marine bivalves *Spisula sachalinensis* (LIV) and *Chlamys albidus* (L₀) were investigated using a homologous series (*n* 2-6) of the laminarioligosaccharides «labeled» at the reducing end by *p*-nitrophenyl radical. HPLC analysis of the products at the initial stage of the enzymatic hydrolysis provided the estimate of the bond cleavage frequencies. According to the subsite theory by Thoma, the affinities of each subsite in LIV and L₀ were evaluated, i. e. the subsite maps for both enzymes were obtained.