



УДК 577.156.02

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

Белок — ингибитор сериновых протеиназ из картофеля с pI 7,3 теряет способность подавлять активность трипсина при химической модификации остатков лизина. Инкубация с трипсином при pH 3 приводит к гидролизу в молекуле ингибитора одной пептидной связи Lys-Glx. Отщепление С-концевого лизина карбоксипептидазой В от такого модифицированного ингибитора сопровождается потерей ингибирующей активности по отношению к трипсину. Модификации такого типа не приводят к снижению активности ингибитора по отношению к химо трипсину. Высказано предположение, что ингибитор содержит два различных центра связывания для трипсина и химо трипсина и что в состав трипсинсвязывающего центра входит аминокислотная последовательность Lys-Glx.

Относительно небольшие участки молекул белков — ингибиторов протеиназ вступают в непосредственный контакт с ферментом с образованием неактивного комплекса фермент — ингибитор. Эти участки получили название реактивных центров ингибиторов [1]. Большинство известных ингибиторов сериновых протеиназ может подавлять активность нескольких различных ферментов. При этом наряду с ингибиторами, имеющими один центр связывания, известны белки, содержащие различные центры, ответственные за связывание определенных ферментов [2, 3].

Цель представленной работы — характеристика трипсинсвязывающего центра ингибитора сериновых протеиназ из картофеля (pI 7,3), выделение и свойства которого были описаны в предшествующей работе [4].

Все известные ингибиторы, действующие на трипсин, содержат в реактивном центре остатки лизина или аргинина [1]. Первые, «лизиновые» ингибиторы теряют активность при обработке ангидридами кислот [5] или 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [6]. Ингибиторы, содержащие в реактивном центре аргинин, напротив, сохраняют активность при обработке реагентами, модифицирующими аминогруппы в белках, но теряют активность при обработке 1,2-циклогександионом [7].

В первой серии опытов ингибитор из картофеля в течение 3 ч обрабатывали малеиновым ангидридом при pH 8 и 4° . Спектрофотометрическое определение числа малеильных групп, включенных в белок (см. «Экспериментальную часть»), показало, что модификации подвергаются 9 из 11 амидных групп, содержащихся в белке (10 ϵ -аминогрупп остатков лизина и одна α -аминогруппа N-концевого остатка метионина [4]). При этом модифицированный ингибитор практически полностью утрачивает способность ингибировать трипсин (рис. 1, а). Наблюдающаяся остаточная ингибиторная активность может быть объяснена присутствием небольшого числа не подвергшихся модификации молекул. Контроль — ингибитор, инкубиро-

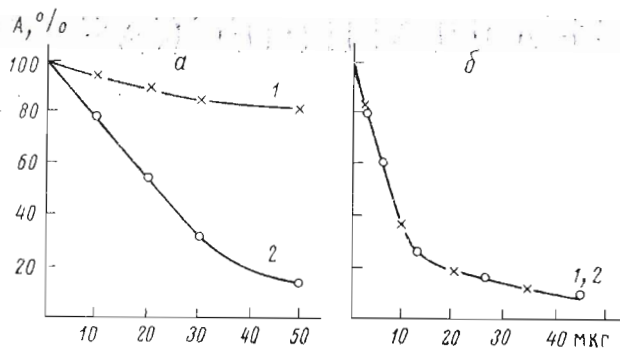


Рис. 1. Влияние блокирования свободных аминогрупп ингибитора из картофеля на его взаимодействие с трипсином (а) и химотрипсином (б); 1 — ингибитор, обработанный малеиновым ангидридом; 2 — контрольный образец. Ось ординат — активность фермента (А), ось абсцисс — мкг ингибитора на 90 мкг трипсина (а) или 35 мкг химотрипсина (б) (в расчете на активные ферменты, содержание которых в препаратах определялось титрованием активных центров)

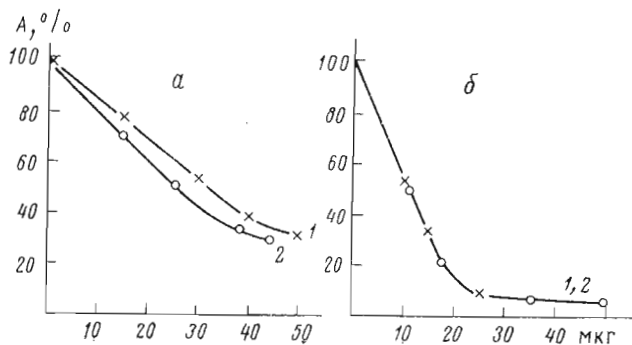


Рис. 2. Влияние модификации гуанидиновых групп ингибитора из картофеля на его взаимодействие с трипсином (а) и химотрипсином (б); 1 — ингибитор, обработанный 1,2-циклогександиолом; 2 — контрольный образец. Обозначения осей как на рис. 1

ванный в тех же условиях без малеинового ангидрида, имел ту же активность, что и нативный ингибитор. В то же время активность малеилированного ингибитора по отношению к химотрипсину не отличается от активности контрольного образца и нативного ингибитора (рис. 1, б). Полученные данные позволяют предположить, что изучаемый ингибитор из картофеля содержит в реактивном центре остаток лизина. Полное сохранение способности ингибировать химотрипсин у малеилированного ингибитора свидетельствует о том, что потеря активности по отношению к трипсину является результатом модификации функционально важных групп и не связана с изменением общей конформации молекулы белка вследствие введения в нее большого числа отрицательно заряженных групп. Кроме того, этот результат указывает на то, что ингибитор из картофеля относится к числу ингибиторов, содержащих различные центры связывания для трипсина и химотрипсина.

Заключение о том, что изучаемый ингибитор принадлежит к «лизиновому типу» ингибиторов трипсина, подтверждается опытами по модификации остатков аргинина в белке с помощью 1,2-циклогександиона. Анализ аминокислотного состава ингибитора, обработанного 1,2-циклогександионом в условиях, вызывающих практически полную инак-

вацию ингибиторов, содержащих в реактивном центре остатки аргинина [7], показал, что модификации подверглись 2—3 остатка аргинина из 4 присутствующих в белке (контроль — 4,2, опыт — 1,5 моль Arg/моль белка). Это сопровождалось небольшим (приблизительно на 25%) снижением ингибиторной активности по отношению к трипсину по сравнению с нативным ингибитором (рис. 2). Аналогичная потеря активности наблюдалась при реакции с 1,2-циклогександионом других ингибиторов трипсина, содержащих в реактивных центрах остатки лизина [7]. Предполагается, что подобное снижение активности может быть связано с сопутствующей модификацией части аминокрупп или с денатурацией белка в щелочной среде. Второе объяснение для ингибитора из картофеля кажется более вероятным, так как близкий по величине эффект наблюдается и в контрольном образце, не подвергнувшемся обработке 1,2-циклогександионом. Небольшое снижение активности наблюдалось также в опытном образце по отношению к химотрипсину (рис. 2, б).

Озава и Ласковский [8] показали, что ингибиторы трипсина, устойчивые к протеолизу в обычных условиях, в кислой среде подвергаются специфическому расщеплению трипсином по связи, образованной карбоксильной группой основной аминокислоты, расположенной в реактивном центре ингибитора. Получающиеся при этом модифицированные ингибиторы состоят из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными мостиками, и сохраняют способность ингибировать трипсин. Однако последующее отщепление остатка основной аминокислоты, входящей в состав реактивного центра, с помощью карбоксипептидазы В сопровождается инактивацией модифицированных ингибиторов.

Ингибитор из картофеля инкубировали с трипсином при pH 3 в течение 48 ч при комнатной температуре. О содержании модифицированной формы ингибитора судили по количеству основной аминокислоты, освобождающейся при последующей обработке карбоксипептидазой В [9]. Выход С-концевых аминокислот после 4-часового гидролиза карбоксипептидазой приведен в таблице. Видно, что из 1 моль препарата ингибитора, обработанного трипсином, освобождается 0,43—0,45 моль лизина, который отсутствует в смеси после обработки карбоксипептидазой В, нативного ингибитора и контрольного образца. На основании величины выхода С-концевого лизина степень модификации ингибитора можно считать равной 40—50%. N-Концевые аминокислоты в контрольном образце и в ингибиторе, обработанном трипсином, определяли дансильным методом [10]. N-Концевым аминокислотным остатком нативного ингибитора является метионин. В гидролизате обработанного дансилхлоридом контрольного образца обнаружены Dns-Met, Lys (Dns), Tyr (Dns) и следовые количества Dns-Val. В гидролизате дансильированного модифицированного ингибитора в сравнении с контрольным образцом появилось дополнительное дансилпроизводное Glx (использованный метод определения не позволяет отличить Glu от Gln). Следовательно, связь, специфически гидролизуемая в ингибиторе из картофеля трипсином, может быть идентифицирована как Lys—Glx.

Освобождение аминокислот (моль/моль белка) из препаратов ингибитора в присутствии карбоксипептидазы В

Препарат ингибитора	Thr	Ser	Lys	Arg
Нативный ингибитор	0,002	0,010	—	0,007
Модифицированный	0,002	0,013	0,450	0,007
трипсином при pH 3	0,004	0,003	0,430	0,004
Контроль (инкубирован	0,003	0,004	—	0,007
при pH 3 без трип-	0,004	0,003	—	0,004
сина)				

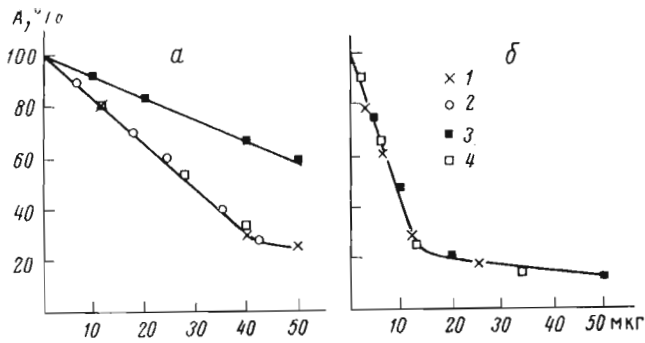


Рис. 3. Влияние протеолитического расщепления ингибитора из картофеля на его взаимодействие с трипсином (а) и химотрипсином (б): 1 — модифицированный ингибитор, полученный при инкубации с трипсином при pH 3; 2 — контрольный образец, инкубированный при pH 3 без трипсина; 3 — модифицированный ингибитор после обработки карбоксипептидазой В; 4 — контрольный образец после обработки карбоксипептидазой В. Обозначения осей как на рис. 1

Ингибитор с расщепленной пептидной связью Lys—Glx сохраняет полную активность по отношению к трипсину и химотрипсину (рис. 3). Оказалось, однако, что модифицированный ингибитор реагировал с трипсином значительно медленнее, чем нативный. Аналогичное явление наблюдалось для других модифицированных ингибиторов трипсина [8]. Обработка препарата ингибитора, модифицированного трипсином, карбоксипептидазой В сопровождается снижением ингибиторной активности по отношению к трипсину на 50% (рис. 3, а), что коррелирует с содержанием модифицированной формы ингибитора (40—50% по выходу С-концевого лизина, таблица). Отщепление С-концевого лизина от модифицированного ингибитора не влияло на его способность подавлять активность химотрипсина (рис. 3, б).

Полученные данные позволяют предположить, что ингибитор сериновых протеиназ с рI 7,3, выделенный из клубней картофеля с помощью метода изоэлектрического фокусирования [4], содержит два различных центра связывания для трипсина и химотрипсина. В состав трипсинсвязывающего центра ингибитора входит аминокислотная последовательность Lys—Glx. Таким образом, по строению реактивного центра ингибитор отличается от других ингибиторов, выделенных из картофеля. Ингибитор, исследованный Хоштрассером и др. [11], содержит в реактивном центре остаток аргинина, в то время как белок II-а, полученный Ивасаки с сотр. [12], хотя и относится к ингибиторам трипсина «лизинового типа», характеризуется наличием одного общего центра связывания для трипсина и химотрипсина.

Присутствие Glx, связанного с лизином, в реактивном центре ингибитора трипсина показано в настоящей работе впервые. Как правило, в этом положении содержатся остатки алифатических аминокислот или аминокислот с гидрофобными боковыми цепями [1]. Известно, что остатки аминокислот кислого характера, расположенные в непосредственной близости к чувствительной связи, снижают скорость триптического гидролиза. Как показали Абита и др. [13], этот эффект связан главным образом с увеличением K_m ферментативного гидролиза. Поскольку реактивный центр ингибитора должен обладать повышенным сродством к ферменту, присутствие в трипсинсвязывающем центре ингибитора из картофеля остатка Gln (а не Glu) кажется более вероятным. Интересно отметить, что последовательность Lys—Gln встречается в составе всех 4 субъединиц ингибитора химотрипсина I [14], выделенного из клубней картофеля Рианом [15] и отличающегося по свойствам от ингибитора с рI 7,3, исследованного в на-

стоящей работе. К сожалению, строение трипсинсвязывающего центра ингибитора химотрипсина I еще не изучено.

Как видно из приведенных выше данных, модифицированный ингибитор с расщепленной пептидной связью Lys—Glx, состоящий из двух полипептидных цепей, сохраняет свою активность. Это, вероятно, свидетельствует о том, что трипсинсвязывающий центр ингибитора из картофеля с pI 7,3, подобно реактивным центрам всех других исследованных ингибиторов сериновых протеиназ, располагается внутри «дисульфидной цепи» — относительно короткого отрезка полипептидной цепи.

Экспериментальная часть

Ингибитор выделяли из клубней картофеля, как было описано ранее [4]. Трипсин (КФ 3.4.4.4), продажный препарат фирмы Spofa (ЧССР), очищали перекристаллизацией из сульфата магния [16]. Содержание активного фермента, определенное методом титрования активных центров [17], составляло 73%. Химотрипсин (КФ 3.4.4.5) производства Олайнского завода химических реактивов очищали с помощью хроматографии на СМ-сефадексе С-50 [18]. Содержание активного фермента в очищенном препарате составляло 88% [19]. Карбоксипептидаза В (КФ 3.4.2.2) — препарат фирмы Worthington (США).

Активность трипсина и химотрипсина определяли потенциометрически [20] на рН-стате (Radiometer ТТТ-1с, Дания). В качестве субстратов использовали этиловый эфир α -N-бензоил-DL-аргинина (Reanal, Венгрия) для трипсина и этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина (Reanal) для химотрипсина. При определении ингибирующей активности ингибитор (10—50 мкг) инкубировали с ферментом (трипсин — 90 мкг, химотрипсин — 35 мкг, рН 8) при комнатной температуре и затем определяли остаточную ферментативную активность, как указано выше. Время инкубации с ферментом составляло 5 мин для нативного ингибитора и 120 мин для ингибитора, подвергнутого обработке трипсином при рН 3.

Для определения аминокислотного состава (расчет на 6 остатков аланина в молекуле ингибитора [4]) белок гидролизовали 5,7 н. HCl при 110° в вакууме 24 ч. Анализ проводили на анализаторе Biocal BC 201F.

Реакцию белка с 1,2-циклогександионом проводили по методу Фини с сотр. [7] в триэтиламиновом буфере при рН 10,5 в присутствии 0,01 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (использовался 100-кратный молярный избыток реагента) в течение 24 ч при комнатной температуре в темноте. Белок отделяли на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М раствором аммиака, и лиофилизовали. Контрольный образец инкубировали в аналогичных условиях без добавления 1,2-циклогександиона.

Реакцию малеилирования белка проводили при рН 8 в течение 3 ч при 4°, используя 60-кратный молярный избыток малеинового ангидрида. Ангидрид добавляли тремя порциями — в начале реакции, через 1 и 2 ч инкубации. Постоянное значение рН поддерживали с помощью рН-стата. По окончании реакции белок отделяли на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М раствором аммиака, и лиофилизовали. Контрольный образец обрабатывали аналогичным образом, но без добавления малеинового ангидрида. Степень модификации оценивали, определяя количество малеильных групп (n), включенных в белок [21]. Расчет проводили по формуле

$$n = \frac{D_{280} \cdot \epsilon_{250} - D_{250} \cdot \epsilon_{280}}{D_{250} \cdot 310 - D_{280} \cdot 3360},$$

где 310 и 3360 — молярные коэффициенты экстинкции для малеильной группы при длине волны 280 и 250 нм; ϵ_{250} и ϵ_{280} — молярные коэффициенты экстинкции белка при 250 и 280 нм, равные соответственно 9136 и

11 394; D_{250} и D_{280} — оптические плотности растворов малеилированного ингибитора при соответствующих длинах волн.

Специфический гидролиз ингибитора трипсином (молярное отношение 50 : 1) проводили в 0,1 М уксусной кислоте в присутствии 0,05 М CaCl_2 , рН раствора доводили до 3 с помощью ледяной уксусной кислоты. После добавления трипсина смесь инкубировали 48 ч при комнатной температуре и лиофилизовали. Контрольный образец инкубировали в аналогичных условиях, но без трипсина. Контрольный образец, нативный и модифицированный с помощью трипсина ингибитор подвергали действию карбоксипептидазы В при рН 8 и 37° (отношение фермент — ингибитор 1 : 50 по весу) [9] (см. таблицу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Laskowski M., Jr., Sealock R. W. (1971) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), vol. 3, pp. 375, Acad. Press, N. Y.—London.
2. Krahn J., Stevens F. C. (1970) *Biochemistry*, 9, 2646—2652.
3. Frattali V., Steiner R. F. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 34, 480—487.
4. Мосолов В. В., Малова, Е. Л., Валуева Т. А., Шульмина А. И. (1975) *Биоорганическая химия*, 1, 1449—1457.
5. Fritz H., Fink E., Gebhardt M., Hochstrasser K., Werle E. (1969) *Z. physiol. Chem.*, 350, 933—944.
6. Haynes R., Osuga D. T., Feeney R. E. (1967) *Biochemistry*, 6, 541—547.
7. Liu W. H., Feinstein G., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R. E. (1968) *Biochemistry*, 7, 2886—2892.
8. Ozawa K., Laskowski M., Jr. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 3955—3961.
9. Fraenkel-Conrat H., Harris I., Levy A. L. (1955) in *Methods of Biochemical Analysis* (Glick D., ed.), vol. 2, pp. 359—362, Interscience Publ. Inc., N. Y.
10. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, 89, 59P.
11. Hochstrasser K., Werle E. (1969) *Z. physiol. Chem.*, 350, 897—902.
12. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M. (1973) *J. Biochem.*, 73, 1039—1048.
13. Abita J. P., Delaage M., Lazdunski M., Savrda J. (1969) *Eur. J. Biochem.*, 8, 314—324.
14. Richardson M., Cossins L. (1974) *FEBS Lett.*, 45, 11—13.
15. Melville J. C., Ryan C. A. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 3445—3453.
16. Нортроп Д., Куницц М., Херригг П. М. (1950) в кн. *Кристаллические ферменты*, с. 240—255, Изд-во иностр. лит., М.
17. Chase T., Jr., Shaw E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 29, 508—514.
18. Nakagawa Y., Bender M. L. (1970) *Biochemistry*, 9, 259—267.
19. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) *J. Biol. Chem.*, 233, 2930—2936.
20. Laskowski M. (1955) in *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 2, pp. 36—54, Acad. Press, N. Y.
21. Freedman M. H., Grossberg A. L., Pressman D. (1968) *Biochemistry*, 7, 1941—1950.

Поступила в редакцию
17.II.1976

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

VALUEVA T. A., MOSOLOV V. V.

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

Modification of the inhibitor with maleic anhydride has been shown to result in almost no detectable trypsin-inhibitory activity. Limited proteolysis by trypsin at pH 3.0 with subsequent carboxypeptidase B treatment exert practically the same effect, chymotrypsin-inhibitory activity being retained after all the above mentioned modifications. It is suggested that the inhibitor has two different binding sites for trypsin and chymotrypsin, respectively, and that the Lys-Glx sequence constitutes a part of the trypsin-binding site.