



УДК 547.963.4+548.737

ЛЕГГЕМОГЛОБИН II ЖЕЛТОГО ЛЮПИНА.
ОСОБЕННОСТИ ЕГО СТРУКТУРЫ В СРАВНЕНИИ
С МИОГЛОБИНОМ КАШАЛОТА

Вайнштейн В. К., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г.

*Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова
Академии наук СССР, Москва*

Егоров Ц. А.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведен сравнительный анализ третичных структур леггемоглобина II желтого люпина и миоглобина кашалота. Оба белка имеют довольно сходную пространственную структуру, различаясь в некоторых деталях, что, возможно, связано со специфической функцией этих молекул. В отличие от миоглобина молекула леггемоглобина имеет 7 спиралей (*A, B, C, E, F, G, H*), из которых спирали *E* и *F* удлинены соответственно на 5 и 4 остатка; спираль *D* практически отсутствует. Все неспиральные участки укорочены, за исключением участка *CD*, который удлинён на 2 остатка. При сопоставлении аминокислотных последовательностей обоих белков с учетом расположения спиральных и неспиральных участков оказываются инвариантными 26 аминокислотных остатков, включая дистальный *E7* и проксимальный *F10* (*F8* по миоглобиновой номенклатуре) остатки гистидина; *Phe CD1*, а также ряд других аминокислот, которые, за исключением *His B5*, *Ile B11* и *Lys CD5*, в обеих молекулах участвуют в одной и той же системе контактов. Удлинение спирали *E* и удаление участка *EF* от гема привело к образованию полости между спиралями *E, F, H* и участком *EF*, которая не описана в миоглобине. Полость гемового кармана в леггемоглобине больше и, по-видимому, может вмещать более крупные лиганды, чем O_2 . Гем находится в окружении боковых цепей гидрофобных аминокислот, которые, как и в миоглобине, образуют три кластера. Кластеры в обеих молекулах весьма сходны по строению. Однако кластер дистального гистидина в леггемоглобине отличается высоким содержанием ароматических аминокислот, а кластер проксимального гистидина — более плотной упаковкой и отсутствием полости, обнаруженной в миоглобине.

Характерной особенностью белков семейства гемоглобинов, выделенных из различных источников (животные, насекомые, кольчатые черви, моллюски), является сходство их третичной структуры, которую часто называют укладкой полипептидной цепи миоглобинового типа [1—5].

Леггемоглобин, обнаруженный в клубеньках ряда бобовых растений, инокулированных бактериями штамма *Rhizobium*, является мономерным гемопротеидом, функция которого предположительно заключается в снабжении кислородом азотфиксирующих бактерий [6]. Недавно в Институте биоорганической химии АН СССР им. М. М. Шемякина установлена первичная структура двух основных компонентов леггемоглобина, выделенных из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus* L.), — леггемоглоби-

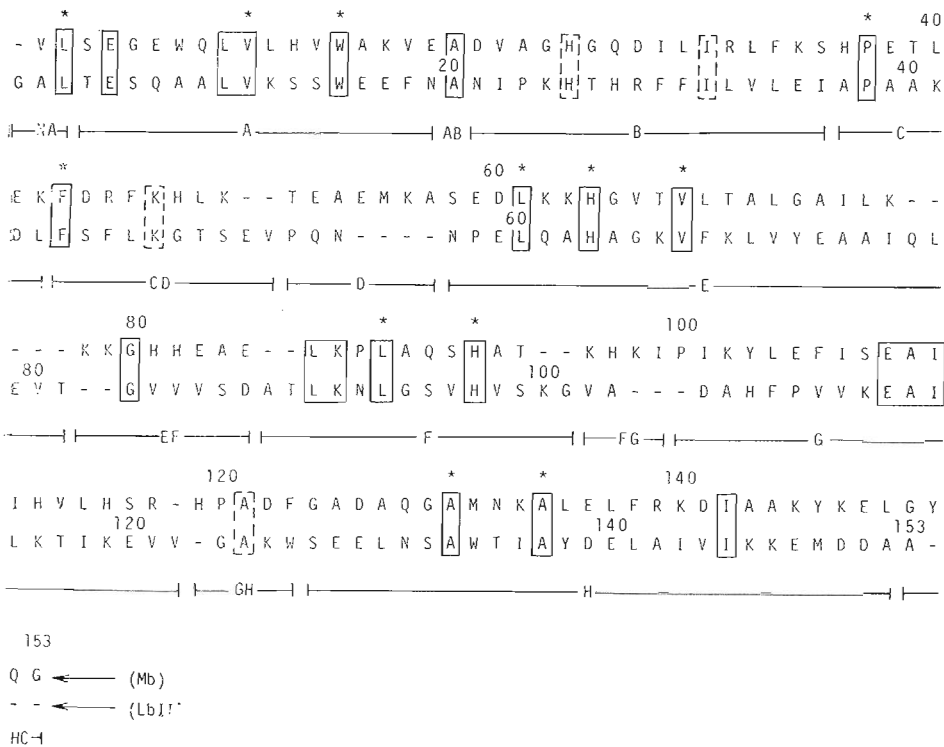


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей миоглобина (Mb) кашалота и леггемоглобина II желтого люпина (Lb) в соответствии с данными рентгеноструктурного анализа. В рамках показаны инвариантные остатки. Звездочками отмечены аминокислоты, выполняющие одинаковую роль в обоих белках. В пунктирных рамках показаны инвариантные аминокислоты, которые в сравниваемых белках участвуют в различной системе контактов. A — Ala, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr

на I и леггемоглобина II, различающихся 20 аминокислотными остатками [7, 8], а в Институте кристаллографии АН СССР им. А. В. Шубникова определена третичная структура леггемоглобина II с разрешением 2,8 Å [9]. Оказалось, что леггемоглобин принадлежит к белкам миоглобинового типа. Однако известно, что леггемоглобин отличается от миоглобина рядом свойств, в особенности способностью связывать кислород [10], а также некоторые объемные лиганды, такие, как никотиновая кислота [11] и алифатические кислоты [12]. В связи с этим представлялось интересным проследить особенности строения этих гомологичных молекул. В настоящей работе проведен сравнительный анализ первичной и пространственной структур леггемоглобина II люпина и миоглобина кашалота, структура которого была уточнена Такано при разрешении 2 Å [13].

Гомология первичной и пространственной структур. О степени гомологии первичной структуры белков можно судить, сопоставляя аминокислотные последовательности по принципу получения наибольшего сходства. Однако такое сравнение без учета пространственной структуры не позволяет выявить действительную степень гомологии родственных белков. Очевидно, что наиболее точная картина может быть получена при расположении аминокислотных последовательностей в соответствии с данными рентгеноструктурного анализа. На рис. 1 приведено такое распределение аминокислотных последовательностей миоглобина кашалота и леггемоглобина II люпина по спиральным и неспиральным участкам. При этом из 153 аминокислотных остатков, имеющих в каждом из белков, инвариант-

ными оказываются только 26. Из них 13, существенные для функции или поддержания структуры, выполняют одинаковую роль в обоих белках (на рис. 1 они отмечены звездочками). К ним относятся: остатки дистального (*E7*) и проксимального (*F8*) гистидинов; Phe *CD1*, плоскость ароматического кольца которого параллельна плоскости гема; Pro *C2*, обеспечивающий резкий поворот цепи при переходе от спирали *B* к спирали *C*; Leu *N43*, фиксирующий N-концевой участок полипептидной цепи у поверхности глобулы; Val *A8*, Leu *E4*, Val *E11*, Ile *G11*, Leu *F6*, Ile *H11*, входящие в состав гидрофобных кластеров; Trp *A12*, расположенный в щели между спиралями *A* и *E*, и Ala *H7*. Из остальных 13 инвариантных остатков три несколько различаются по расположению в глобулах сравниваемых белков: остаток His *B5* в леггемоглобине сближен со спиралью *G*, а не с участком *GH*, как в миоглобине; боковая цепь Lys *CD5* в леггемоглобине направлена в растворитель, в то время как в миоглобине она образует солевую связь с Asp *CD2* и стабилизирует конфигурацию полипептидной цепи на участке *CD*; остаток Ile *B11* в леггемоглобине контактирует с участком *CD*, а не со спиралью *D*.

Несмотря на малое число абсолютных совпадений в аминокислотной последовательности, миоглобин и леггемоглобин довольно сходны по третичной структуре. Это обстоятельство становится более понятным, если учесть следующее. Из 82 аминокислотных остатков, инвариантных для миоглобинов 24 видов животных*, 37 остатков в сравниваемой паре хотя и отличаются по химической природе, но в каждой из молекул участвуют в одной и той же системе контактов, т. е. являются позиционно эквивалентными (см. табл. 1). Еще в 13 случаях при заменах сохраняется гидрофобный либо гидрофильный характер остатка. В итоге около 75% рассмотренных замен не оказывают заметного влияния на конфигурацию полипептидной цепи. Особо важная роль гидрофобных контактов для поддержания структуры белковой глобулы подчеркивалась неоднократно. Так, при анализе структуры пяти глобинов (α - и β -цепи гемоглобинов, миоглобин, гемоглобин миноги и эритрокруорин), проведенном Козицыным и Птицыным [14], было показано, что в каждом из них сохраняется 15 из 30 гидрофобных контактов. Из этих 15 контактов, общих для упомянутых белков, 10 существуют и в молекуле леггемоглобина (табл. 2).

При оценке сходства белков по аминокислотной последовательности замены, изменяющие полярность остатка, часто относят к «неразрешенным». Однако это не всегда справедливо. Взаимодействие между парой аминокислотных остатков может сохраниться, если полярность обоих контактирующих партнеров меняется в структуре одновременно. Например, конфигурация полипептидной цепи миоглобина на участке *GH* поддерживается водородной связью между остатками Asp *GH4* и Lys *A14*, причем эта связь очень характерна и имеется во всех пор изученных миоглобинах и гемоглобинах животного происхождения. В полипептидной цепи леггемоглобина полярные остатки поменялись местами, т. е. место Asp *GH4* занимает Lys *GH3*, а место Lys *A14* занимает Glu *A14*, при этом положение контакта в пространстве молекулы сохранилось (см. рис. 1 и табл. 1).

Не всегда нарушает структурную гомологию небольшое смещение одного из контактирующих остатков вдоль полипептидной цепи, поскольку пространственное положение контактирующих боковых цепей в этом случае меняется мало. Например, один из контактов между спиралями *G* и *H* в миоглобине осуществляется с помощью водородной связи между Glu *G6* и Arg *H16*, а в леггемоглобине на расстояние ван-дер-ваальсовых радиусов сближены Pro *G5* и боковая цепь Lys *H20* и т. д. (см. табл. 1). Эти факты еще раз подтверждают, что лишь совокупный анализ первичной и пространственной структур выявляет истинную степень гомологии белков.

* По данным Такано [13].

Расположение некоторых аминокислотных остатков в миоглобине кашалота * и лег гемоглобине II люпина

Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральной или диспиральной частях	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральной или диспиральной частях	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***
Миоглобин							
2	A42	Leu (в)	В контакте со спиралью H	3	A43	Leu (в)	В контакте со спиралью H
3	A1	Ser (н)	Водородная связь с NH-группой Glu A4	4	A1	Thr (н)	Водородная связь с γ-SO-группой Glu E23
6	A4	Glu (н)	Водородная связь с Ser A1, стабилизирует Leu A42	7	A4	Gln (н)	Водородная связь с Glu H3
7	A5	Trp (н)	Между Leu A42 и Lys EF2	8	A5	Ala (н)	Роль неясна
10	A8	Val (в)	В контакте со спиралью H, в гидрофобном кластере III	11	A8	Val (в)	В контакте со спиралью H (Trp H8 и Leu H4)
11	A9	Leu (н)		12	A9	Lys (н)	Водородная связь с Glu A13
14	A12	Trp (н)	Водородная связь с Glu A16, который в свою очередь связан с Lys E20; удерживает спираль A и E вместе	15	A12	Trp (н)	л-Электронное взаимодействие индольного кольца с арильным кольцом Trp E16, удерживает спираль A и E вместе
16	A14	Lys (н)	Солевой мостик с Asp GH4	17	A14	Glu (н)	Взаимодействие с Lys GH4
17	A15	Val (в)	Входит в гидрофобный кластер III	18	A15	Phe (в)	Входит в гидрофобный кластер III
18	A16	Glu (н)	Водородная связь с Trp A12	19	A16	Asn (н)	Контактирует с растворителем
20	B1	Asp (н)	Водородная связь с NH-группой Glu B4, стабилизирует угол между спиралью A и B	21	B1	Asn (н)	Водородная связь с NH-группой Lys B4, стабилизирует угол между спиралью A и B
24	B5	His (в)	Водородная связь с His GH4, стабилизирует участок GH	25	B5	His (в)	Контакт с Phe A15 и Val G18
25	B6	Gly (в)	Контакт с Gly E8	26	B6	Thr (в)	Контакт с Ala E8
29	B10	Leu (в)	Входит в гидрофобный кластер I	30	B10	Phe (в)	Входит в гидрофобный кластер I
Леггемоглобин							

Таблица 1 (продолжение)

Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***
Многлобин							
30	B11	Phe (п)	Контакт между спиралью В и D	31	B11	Phe (п)	Контакт с участком CD
32	B13	Leu (в)	Входит в гидрофобный кластер I	33	B13	Val (в)	Входит в гидрофобный кластер I
33	B14	Phe (в)	Входит в гидрофобный кластер I	34	B14	Leu (п)	Контакт со спиралью C
36	C1	His (п)	Контакт с Phe C7	37	C1	Ala (п)	Контакт с Val C6
37	C2	Phe (п)	Крутой поворот от спирали В к спирали С	38	C2	Phe (п)	Крутой поворот от спирали В к спирали С
38	C3	Glu (н)	Водородная связь с NH-группой Glu C3	39	C3	Ala (н)	Роль неясна
39	C4	Thr (в)	Контакт с гемом, водородная связь с СО-группой His C1	40	C4	Ala (в)	Расположен на расстоянии 5 Å от гема
40	C5	Leu (п)	Расположен между спиралью С и участком CD	41	C5	Lys (н)	Водородная связь с Thr CD7, расположен между спиралью С и участком CD
41	C6	Glu (н)	В контакте с Lys CD8 через молекулу H ₂ O	42	C6	Asp (н)	Остаток плохо фиксирован
43	CD1	Phe (в)	Контакт с гемом; параллелен плоскости гема; входит в кластер I	44	CD1	Phe (в)	Контакт с гемом; параллелен плоскости гема; входит в кластер I
44	CD2	Asp (н)	Солевая связь с Lys CD5, стабилизирует участок CD	45	CD2	Ser (н)	Водородная связь с пропионовой кислотой пиррола III
46	CD4	Phe (в)	Входит в кластер I	47	CD4	Leu (в)	Входит в кластер I, взаимодействует со спиралью С
47	CD5	Lys (н)	Солевая связь с Asp CD2, стабилизирует участок CD	48	CD5	Lys (н)	Взаимодействует с растворителем
48	CD6	His (п)	В контакте с СО-группой Asp CD2 через молекулу H ₂ O, стабилизирует участок CD	49	CD6	Gly (н)	Роль неясна
Леггемоглобин							

Таблица 1 (продолжение)

Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или беспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или беспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Леггемоглобин	
								Многлоглобин	Леггемоглобин
49	CD7	Leu (n)	В гидрофобном кластере His E7	50	CD7	Thr (n)	Водородная связь с Lys C5, стабилизирует угол между спиралью C и участком CD	Thr (n)	Водородная связь с Lys C5, стабилизирует угол между спиралью C и участком CD
50	CD8	Lys (n)	В контакте с СО-группой Asp CD2 через H ₂ O, стабилизирует участок C	51	CD8	Ser (n)	Направлен в растворитель	Ser (n)	Направлен в растворитель
55	D5	Met (b)	Расположен между участком CD и спиралью D	57	E1	Asn (n)	В леггемоглобине отсутствует	Asn (n)	Водородная связь с NH-группой Leu E4
58	E1	Ser (n)	Водородная связь с СО-группой Leu E4, начало спирали E	58	E2	Pro (n)	Поворот к спирали E	Pro (n)	Поворот к спирали E
59	E2	Glu (n)	В контакте с Lys E5 через молекулу H ₂ O	60	E4	Leu (b)	Входит в кластер I	Leu (b)	Входит в кластер I
61	E4	Leu (n)	Входит в кластер I	62	E6	Ala (b)	Солевой мостик с соседней молекулой	Ala (b)	Солевой мостик с соседней молекулой
63	E6	Lys (n)	Солевой мостик с соседней молекулой	63	E7	His (b)	Водородная связь с шестым лигандом, контакт с гемом	His (b)	Водородная связь с шестым лигандом гема
64	E7	His (b)	Водородная связь с шестым лигандом, контакт с гемом	64	E8	Gly (b)	В контакте с Gly B6	Ala (b)	В контакте с Thr B6
65	E8	Gly (b)	В контакте с Gly B6	67	E11	Val (b)	Контакт с гемом, входит в кластер I	Val (b)	Контакт с гемом, входит в кластер I
68	E11	Val (b)	Контакт с гемом, входит в кластер I	68	E12	Leu (b)	Входит в кластер III	Phe (b)	Входит в кластер I
69	E12	Leu (b)	Входит в кластер III	70	E14	Ala (n)	Контакт с гемом	Leu (b)	Контакт с гемом
71	E14	Ala (n)	Контакт с гемом	71	E15	Leu (b)	Контакт с винильной группой гема, входит в кластер III	Val (b)	Контакт с метильной группой спирального кольца I гема, входит в кластер III
72	E15	Leu (b)	Контакт с винильной группой гема, входит в кластер III	72	E16	Gly (n)	Контакт с Thr A12	Tyr (b)	Контакт с Thr A12
73	E16	Gly (n)	Контакт с Thr A12	74	E18	Pro (b)	Входит в гидрофобный кластер II	Ala (b)	Контакт с Leu E14
75	E18	Pro (b)	Входит в гидрофобный кластер II						

Таблица 1 (продолжение)

Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***
Миоглобин							
76	E19	Leu (в)	Гидрофобный кластер III Солевой мостик с Glu A16, стабилизирующий спираль A и E Солевая связь с соседней молекулой	75	E19	Ala (в)	Гидрофобный кластер III Контакт со спиралью A через Ala A5 В леггемоглобине отсутствует
77	E20	Lys (н)		76	E20	Ile (п)	
78	EF1	Lys (н)		82	EF1	Gly (н)	
79	EF2	Lys (н)	Солевой мостик с Glu A2, стабилизирующий N-конец спираль A	84	EF3	Val (п)	То же
80	EF3	Gly (н)	Водородная связь с Asp H18, стабилизирует участок EF и спираль H	86	EF5	Ser (н)	
82	EF5	His (п)		93	F6	Leu (в)	Контакт с Leu F3, Leu H21, стабилизирует участок EF
84	EF7	Ala (н)	Входит в гидрофобный кластер II, контакт с гемом	94	F7	Gly (в)	Входит в гидрофобный кластер II, контакт с гемом Контакт со спиралью H На расстоянии 4,5 Å от гема и His F10 (F8)
89	F4	Leu (в)		96	F9	Val (п)	
90	F5	Ala (п)	Контакт с гемом. Водородная связь с CO-группой Pro F3 или CO-группой Leu F4	97	F10	His (в)	Пятый лиганд железа гема Контакт со спиралью H (Ca Met H23)
92	F7	Ser (п)		98	F11	Val (п)	
93	F8	His (в)	Пятый лиганд железа гема Контакт со спиралью H	100	F13	Lys (н)	Водородная связь с остатком пропионовой кислоты пиррольного кольца III гема
94	F9	Ala (п)		Не определены			
96	FG1	Lys (н)					
Леггемоглобин							

Таблица 1 (продолжение)

Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***
Многлоббин							
97	FG2	His (п)	Контакт с гемом. Водородная связь с остатком проионовой кислоты, стабилизирующая гем и участок FG	102	FG2	Ala (в)	Контакт с гемом, входит в кластер II
100	G1	Pro (н)	Резкий поворот от участка FG к спирали G	104	G1	Asp (н)	Поворот от участка FG к спирали G
104	G5	Leu (в)	Контакт с гемом, входит в гидрофобный кластер II	107	G4	Phe (в)	Контакт с гемом, входит в гидрофобный кластер II
105	G6	Glu (н)	Водородная связь с Arg H16, стабилизирующая спираль G и H	108	G5	Pro (н)	Контакт со спиралью H
107	G8	Ile (в)	Контакт с гемом	110	G7	Val (в)	Контакт с углеродом метильной группы пиррольного кольца II гема
108	G9	Ser (п)	Водородная связь с CO-группой Leu G5	111	G8	Lys (н)	Водородная связь с Asp H13
111	G12	Ile (в)	Входит в гидрофобный кластер III	114	G11	Ile (в)	Входит в гидрофобный кластер III
119	GH1	His (п)	Водородная связь с His B5, стабилизирует участок GH	123	GH1	Gly (в)	
123	GH5	Phe (в)	На дне гидрофобного кластера III	126	GH4	Trp (п)	В гидрофобном кластере III
126	H3	Asp (н)	Водородная связь с NH-группой Ala H4	129	H3	Glu (в)	Водородная связь с Gln A4
130	H7	Ala (п)	Контакт со спиралью A	133	H7	Ala (п)	Контакт со спиралью A
131	H8	Met (в)	Входит в гидрофобный кластер III	134	H8	Trp (н)	Входит в гидрофобный кластер III
Леггемоглобин							

Таблица 1 (окончание)

Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***	Номер в аминокислотной последовательности	Номер в спиральных или неспиральных участках	Аминокислота **	Наиболее существенные контакты ***
Миоглобин							
133	H10	Lys (н)	Солевой мостик с Glu A4, стабилизирующий N-конец спирали A	136	H10	Pro (в)	Контакт с Leu N43 и Leu E22, стабилизирующий N-конец спирали A
134	H11	Ala (в)	Гидрофобный кластер III	137	H11	Ala (в)	Входит в гидрофобный кластер III
135	H12	Leu (в)	Входит в гидрофобный кластер III	138	H12	Tyr (в)	То же
136	H13	Glu (н)	Контакт с Asp H9 через молекулу H ₂ O	139	H13	Asp (н)	
137	H14	Leu (н)	Контакт с гемом, входит в гидрофобный кластер II	140	H14	Glu (п)	Контакт с винильной группой пиррольного кольца гема, входит в кластер II
138	H15	Phe (в)		141	H15	Leu (н)	
139	H16	Arg (п)	Солевой мостик с Glu G6, стабилизирующий спирали G и H	142	H16	Ala (н)	Контакт с Asp G1
141	H18	Asp (н)	Водородная связь с His EF5, стабилизирующая участок EF и спираль H	144	H18	Val (в)	Контакт с участком EF и спиралью F через Leu F3
143	H20	Ala (н)	Водородная связь с СО-группой Ile, FC4, стабилизирующая C-конец спирали H	146	H20	Lys (н)	Водородная связь с Asp G1
146	H23	Tyr (в)		149	H23	Met (в)	
147	H24	Lys (н)	Солевая связь с C-концевой группой белка	150	H24	Asp (н)	
150	HC1	Gly (н)		153	HC1	Ala (н)	
153	HC4	Gly (н)					В легтемоглобине отсутствует

* По данным Такано [13].

** Аминокислотные остатки, расположенные: внутри молекулы (в); снаружи, контактирующие с растворителем (н); в углублениях на поверхности молекулы, частично контактируют с растворителем (п).

*** Под контактом здесь и далее имеется в виду ван-дер-ваальсово взаимодействие.

Гидрофобные контакты между парами аминокислотных остатков в миоглобине и леггемоглобине II

Миоглобин [14]	Леггемоглобин II	Миоглобин [14]	Леггемоглобин II
Tyr H23	—	Gly B6	Thr B6
Phe FG4	—	Gly E8	Ala E8
Phe H19	Phe H19	Gly E8	—
Leu G5	Phe G4	Leu B10	—
Leu F1	—	Leu B10	Phe B10
Phe H15	—	Leu E4	Leu E4
Phe H15	Leu H15	Leu E4	—
Leu E15	Val E15	Phe B14	—
Leu E15	Tyr E16	Phe B14	—
Trp A12	Trp A12	Phe CD1	—
Trp A12	Trp A12	Phe CD1	Phe CD1
Leu E19	Ala E19	Phe CD4	Phe CD3
Leu E19	Ala E19	Phe CD4	Phe CD3
Val A8	Val A8	Leu E4	Leu E4
Phe G8	Val G7		
Leu B13	Val B13		

Из приведенных примеров следует, что конфигурация полипептидной цепи может оставаться постоянной при компенсируемых заменах, а также при заменах, не меняющих объем и полярность остатка и, следовательно, не нарушающих порядок чередования полярных и неполярных аминокислот.

Сравнительная морфология молекул миоглобина и леггемоглобина. Рентгеноструктурный анализ (рис. 1) показал, что, хотя оба белка весьма сходны по количеству и распределению спиральных и неспиральных участков, между ними существуют и определенные различия. Так, из восьми спиральных участков, имеющих в миоглобине (A, B, C, D, E, F, G, H), в леггемоглобине фактически присутствует только семь, так как спираль D состоит из трех остатков и не образует полного витка. Пять спиралей (A, B, C, G, H) совпадают по длине, а спирали E и F в леггемоглобине удлинены на пять и четыре остатка соответственно. Удлинение спирали E с C-конца на пять остатков, что составляет 7,5 Å вдоль ее оси, приводит к удалению от гема неспирального участка EF и изменению его конфигурации, а также к появлению полости между спиралью E, F, H и участком EF, не обнаруженной в миоглобине. Спираль F в леггемоглобине удлинена на два остатка как с N-, так и с C-конца, поэтому начало отсчета в ней смещено, так что проксимальный гистидин F8 по миоглобиновой номенклатуре становится 10-м в спирали F леггемоглобина. Удлиненный C-конец этой спирали фиксирован более жестко, чем в миоглобине, так как ε-аминогруппа Lys F13 связана водородной связью с карбоксильной группой пропионовой кислоты пиррола III порфиринового кольца.

Ориентация спиралей A, B, C, E, F и H относительно ядра глобулы довольно сходна. Благодаря этому в большинстве межспиральных контактов участвуют пары остатков, занимающие одинаковую позицию в соответствующих спиральях сравниваемых белков. Исключение составляет спираль G леггемоглобина. Хотя общее число остатков этой спирали, контактирующих с гемом, то же, что и в миоглобине, однако из-за несколько иного ее поворота вокруг оси пятый остаток, который в миоглобине сближен с гемом, в леггемоглобине направлен к спирали H, а с гемом сближен остаток Phe G4. На рис. 1 изменение положения спирали G в леггемоглобине показано сдвигом на один остаток относительно соответ-

вующей спирали миоглобина (рис. 1). Кроме того, в отличие от миоглобина эта спираль в леггемоглобине менее регулярная.

На участке максимального сближения спиралей *B* и *E* в миоглобине, как и в большинстве гемоглобинов позвоночных, находятся остатки глицина (*B6* и *E8*). В леггемоглобине соответствующей парой являются остатки большего объема (*Thr B6* и *Ala E8*). Вследствие этого в леггемоглобине спирали *B* и *E* расходятся больше и несколько увеличивается объем гемового кармана.

Среди неспиральных участков сравниваемых белков также наблюдаются различия. Так, участки *CD* и *EF* в леггемоглобине фиксированы менее жестко, чем в миоглобине, что затрудняет выяснение роли входящих в них аминокислотных остатков. Участок *CD* в леггемоглобине расположен несколько иначе относительно глобулы. Боковая цепь *Lys CD5*, которая в миоглобине образует водородную связь с *Asp CD2* и тем самым стабилизирует конфигурацию полипептидной цепи, в леггемоглобине направлена в растворитель, а боковая цепь *Ser CD2* развернута в сторону гема и вместе с ϵ -амино группой *Lys F13* образует водородную связь с карбоксильной группой пиррола III. В миоглобине аналогичную роль выполняет остаток *Arg CD3*. Конфигурация участков *EF* в обеих молекулах также различна. Тем не менее остатки *His EF5* в миоглобине и *Ser EF5* в леггемоглобине контактируют с одними и теми же районами спиралей *F* и *H*.

Наиболее короткий в леггемоглобине по сравнению с миоглобином участок *FG*. Он состоит всего из двух остатков. Возможно, что изменение конфигурации этого фрагмента, обычно участвующего в контактах между субъединицами в тетрамерных гемоглобинах, объясняет неспособность леггемоглобина к димеризации. В миоглобине на участке *FG* имеется *His FG2*, связанный водородной связью с карбоксильной группой остатка пропионозой кислоты пиррола IV. В леггемоглобине этот остаток гистидина заменен на остаток аланина, а карбоксильная группа остатка пропионозой кислоты свободна и направлена в растворитель. Остальные два неспиральных участка в леггемоглобине (*GH* и *HC*) также укорочены на один и три аминокислотных остатка соответственно, а участок *NA* удлиннен на один остаток.

Таким образом, в леггемоглобине по сравнению с миоглобином наблюдается тенденция к удлиннению спиральных и укорачиванию неспиральных участков.

Гидрофобные кластеры в леггемоглобине и миоглобине. Леггемоглобин, как и миоглобин, является гидрофобным белком, состоящим на 50% из гидрофобных аминокислот. Остатки гидрофобных аминокислот в миоглобине, обычно далеко отстоящие друг от друга в полипептидной цепи, располагаются, как правило, на внутренних сторонах спиральных и неспиральных участков и образуют в пространстве несколько гидрофобных кластеров — гидрофобное ядро белковой глобулы. Эти остатки находятся на расстоянии ван-дер-ваальсовых радиусов и закрепляют относительное расположение спиралей, создающее характерный пространственный рисунок молекулы. Следует помнить, что способ выделения кластеров несколько произволен, так как часто на границе между кластерами имеются остатки, которые можно отнести к любому из них. Такано выделяет три основных кластера [13]. Их состав в миоглобине и леггемоглобине приведен в табл. 3 и 4.

Кластер I включает в себя гидрофобные остатки между дистальным гистидином, спиралью *B* и участком *CD* (кластер вблизи дистального гистидина) и окружает полость, занимаемую шестым лигандом. Кластер II содержит окружение проксимального гистидина, а кластер III — остатки, выстилающие наиболее удаленную от гема часть полости гемового кармана.

Кластер I леггемоглобина (табл. 3) образован гидрофобными остатками, принадлежащими в основном тем же участкам молекулы, что и в миоглобине, за исключением *Leu B14*, который в леггемоглобине сильно сме-

Таблица 3

Аминокислотные остатки в миоглобине и леггемоглобине II,
входящие в кластер дистального (E7) и
проксимального (F8) гистидинов

Кластер I гистидина E7		Кластер II гистидина F8	
Миоглобин	Леггемоглобин II	Миоглобин	Леггемоглобин II
Val E11 His E7	Val E11 His E7 Phe E12 Phe A15 His B5	His F8 Ile H19 Phe H15 Leu G5	His F10(F8) Ile H19 Leu H15 Phe G4 Met H23 Ala FG2 Leu F6 Val F11
Ile B9 Leu B10 Leu B13 Phe CD1 Leu E4 Phe CD4 Phe B14	Phe B9 Phe B10 Val B13 Phe CD1 Leu E4 Phe CD3	Ile FG4 Leu F4 Ala F9 Ile E18	

Таблица 4

Аминокислотные остатки в миоглобине и леггемоглобине II,
входящие в кластер III

Миоглобин	Леггемоглобин II	Миоглобин	Леггемоглобин II
Leu E12 Ile B9 Ile G12 Met H8 Leu E15 Leu H12	Phe E12 Phe B9 Ile G11 Trp H8 Val E15 Tyr H12	Val A15 Ile B11 His B5 Val A8 Leu E19 Phe GH5 Ala H11	Ala H11 Phe B10 Phe A15 Val A8 Ala E19 Phe GH4

щен к спирали *C* и участку *CD* и в кластер не входит. Остатки Phe B9 и Phe E12 находятся на границе кластеров I и III и рассекают полость гемового кармана на две неравные части, одна из которых вмещает лиганд, роль другой не ясна. В кластере I шесть остатков фенилаланина, сосредоточенных на небольшом участке, связывают в единый узел С-конец спирали *A* и N-концы спиралей *B* и *E*. Ароматические остатки в идентичных положениях имеются во всех до сих пор изученных леггемоглобинах [8] и, возможно, характерны для всей группы этих белков.

Кластер проксимального гистидина (II), как и кластер I, расположен вблизи функционального центра молекулы. Согласно стереохимической гипотезе Перутца [15], в соответствующем районе тетрамерных гемоглобинов начинается конформационная перестройка, сопровождающая связывание лиганда. У ряда гемоглобинов ключевую роль в ней играет остаток Tyr HC3. При оксигенировании гемоглобинов в этом районе происходят наибольшие конформационные изменения: Tyr HC3 вытесняется из кармана между спиральями *E* и *H*, и его смещение в конечном итоге приводит к изменению четвертичной структуры молекулы [16]. В миоглобине соответствующее положение занимает Tyr H23, который участвует в переходе белка из дезокси- в оксиформу; при этом происходит удлинение водородной связи между гидроксилом Tyr H23 и карбонилем Ile FG4 [16]. В леггемоглобине этому остатку соответствует остаток Met H23. В целом кластер II леггемоглобина отличается рядом особенностей. Хотя, как и в миоглобине, он состоит из восьми аминокислотных остатков, лишь пять из них позиционно эквивалентны (табл. 3 и рис. 1). Остатки Leu G5 и Ile FG4 мио-

глобина сопоставимы с остатками Phe G4 и Ala FG2 леггемоглобина. Из-за укорачивания участка FG в леггемоглобине остаток Phe G4 внедряется в кластер глубже, чем соответствующий остаток Leu G5 в миоглобине. Что касается Tyr H23, то в миоглобине он находится рядом с кластером, а в леггемоглобине он заменен на остаток Met H23, который включен в него непосредственно. При этом боковая цепь метионина заполняет пространство между спиралью F, H, G и участком FG. Завершая плотную упаковку остатков на этом участке, остаток метионина защищает гем от проникновения молекул растворителя. В противоположность этому в миоглобине внутри кластера II имеется полость, роль которой не установлена. Без существенной пертурбации остатков она может вмещать атом ксенона (ван-дер-ваальсов радиус 2,2 Å). По положению, занимаемому боковой цепью Met H23, леггемоглобин более всего напоминает гемоглобин Chironomus [3]. В этом белке Met H23, являющийся С-концевым в его полипептидной цепи, ответствен, по-видимому, за эффект Бора: присоединение лиганда вызывает разрыв водородной связи между карбоксильной группой метионина и одним из остатков гистидина, в результате чего освобождается протон и боковая цепь метионина перемещается в кармане между спиралью H и F [17].

Кластер III, занимающий часть полости гемового кармана, в обеих молекулах образован гидрофобными остатками, в основном позиционно эквивалентными. Небольшие различия заключаются в следующем. Вместо His B5 в леггемоглобине в этот кластер входит Phe A15, а вместо He B11 — Phe B10, который отделяет полость внутри района CD от полости гемового кармана. Leu H12 заменен в леггемоглобине остатком Tyr H12. Возможно, что последняя замена наиболее существенна, поскольку в этом случае в полости гемового кармана наряду с дистальным гистидином оказывается вторая полярная группа (ОН-группа Tyr H12). Интересно, что остаток тирозина в этом положении имеется во всех исследованных леггемоглобинах [18], а также в гемоглобине *Glucera* [5]. Хотя все эти гемоглобины отличаются высоким сродством к кислороду, трудно предположить, что ОН-группа влияет на стабильность кислородного комплекса, так как она находится на значительном расстоянии от центра плоскости гема, над которой расположен лиганд. Скорее всего ее присутствие может понизить окислительный потенциал леггемоглобина.

Таким образом, из проведенного анализа видно, что в обеих молекулах кластеры формируются из аминокислотных остатков, занимающих одинаковые или близкие положения, причем замены осуществляются в пределах группы гидрофобных аминокислот. Благодаря этому пространственный рисунок кластеров изменяется незначительно.

Окружение гемгруппы в молекулах леггемоглобина и миоглобина. Активный центр молекул леггемоглобина и миоглобина — гемгруппа, свойства которой существенно зависят от ее окружения. В связи с этим система контактов гема с глобином является важнейшей структурной характеристикой этих молекул. Окружающие гем остатки аминокислот показаны на рис. 2 и перечислены в табл. 5. Среди них неизменные в большинстве гемоглобинов остатки дистального (E7) и проксимального (F8) гистидинов. Число остатков, контактирующих с гемом на стороне дистального гистидина, одинаково в леггемоглобине и миоглобине. Со стороны проксимального гистидина в леггемоглобине с гемом контактирует больше остатков, особенно за счет остатков аминокислот спиралей G и H, которые в миоглобине удалены от гема более чем на 4 Å. В результате гем в леггемоглобине оказывается глубже утопленным в глобулу.

В миоглобине обе карбоксильные группы пропионовых кислот гема связаны водородными связями с апобелком: одна с Arg CD3, а другая — с His FG2. Как уже было упомянуто, в леггемоглобине лишь один из двух остатков пропионовой кислоты связан водородной связью с глобулой, в то время как второй свободен и направлен в растворитель.

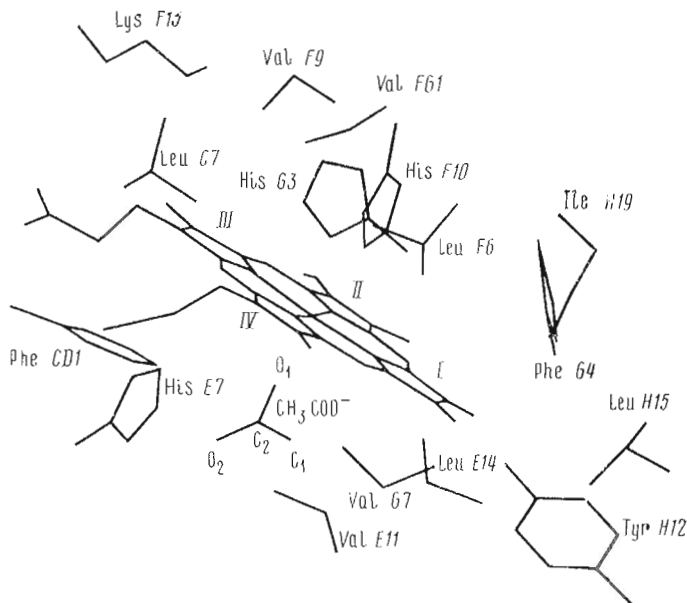


Рис. 2. Изображение гема и его окружения в леггемоглобине II желтого люпина. Показаны аминокислотные остатки, которые расположены от гема на расстоянии не далее 4 Å

Окружение проксимального гистидина в леггемоглобине более гидрофобно. Отсутствует контакт с гемом по остатку Lys E10, боковая цепь которого выходит на поверхность молекулы. Серину F7 миоглобина эквивалентен по положению Val F9, отстоящий несколько дальше от плоскости гема. Суммарное различие в полярных и гидрофобных контактах, вероятно, отражается на конформационной подвижности гемов, однако общая закономерность — сходное расположение контактов в пространстве — соблюдается и в этом случае.

Размер гемового кармана, по-видимому, влияет на степень сродства к кислороду: в полости меньшего объема комплекс с кислородом менее стабилен [4, 5]. В леггемоглобине полость, включающая в себя лиганд, довольно велика. Представление о ее объеме можно получить из расстояния между ближайшими атомами двух пар противоположающихся остатков



и расстояния от плоскости гема до расположенного над ним Phe B10, равного 7 Å. По-видимому, полость гема может вместить молекулы, больше, чем кислород.

По ряду физико-химических тестов гемовый карман в леггемоглобине более доступен для лигандов, чем в миоглобине. Такой вывод следует из работ Элфолка по включению в леггемоглобин молекул алифатических кислот [12]. О том же говорят измерения времени магнитной релаксации протонов [19]. Тем не менее гемовый карман в леггемоглобине не имеет достаточно большого канала для проникновения молекулы O₂. Этому препятствует имидазольное кольцо дистального гистидина и боковая цепь Val E11. По данным Такано [16], при вхождении лиганда в гемовую полость миоглобина дистальный гистидин сдвигается. При этом условии вход в полость гемового кармана между His E7, Phe CD1 и Phe CD3 возможен и в леггемоглобине. Кроме того, в леггемоглобине гемовый карман становится доступным для лиганда и с противоположной стороны, между спиральями C и G, при повороте имидазольного кольца His G3 вокруг свя-

Аминокислотные остатки, окружающие гем
(на расстоянии не более 4Å)

Миоглобин	Леггемоглобин	Миоглобин	Леггемоглобин
Phe <i>CD1</i>	Phe <i>CD1</i>	Tyr <i>G4</i>	Phe <i>G4</i>
Arg <i>CD3</i>	Ser <i>CD2</i>	Leu <i>G5</i>	Val <i>G6</i>
His <i>E7</i>	His <i>E7</i>	His <i>G8</i>	Val <i>G7</i>
Thr <i>E10</i>	—	—	His <i>G3</i>
Val <i>E11</i>	Val <i>E11</i>	—	Leu <i>C7</i>
Ala <i>E14</i>	Leu <i>E14</i>	—	Leu <i>F6</i>
Leu <i>E15</i>	Val <i>E15</i>	—	Lys <i>F13</i>
Ser <i>F7</i>	—	—	Tyr <i>H12</i>
His <i>F8</i>	His <i>F10 (F8)</i>	—	His <i>H19</i>
His <i>FG2</i>	—	—	Leu <i>H15</i>
His <i>FG4</i>	—	—	

зи C_{β} — C_{γ} . Однако, оценивая доступность гемовой полости, следует иметь в виду, что в данной работе изучался гексакоординационный комплекс леггемоглобина, содержащий ион ацетата в качестве шестого лиганда у атома железа [9]. Конформационные состояния молекулы леггемоглобина в случае пяти- и шестикоординационных комплексов могут быть различны.

Сходство пространственных структур молекул миоглобина и леггемоглобина дает основание предположить, что оба белка произошли от общего предшественника, как и другие представители семейства гемоглобинов. Эта точка зрения наиболее широко распространена среди специалистов. Однако нельзя в принципе исключить и другой путь происхождения леггемоглобина — конвергентную эволюцию. В любом случае для функционирования белка важна совершенно определенная конформация полипептидной цепи и наличие некоторых аминокислотных остатков, существенных для взаимодействия с гемом и участия в конформационной перестройке молекулы.

В настоящее время общепризнано, что третичная структура глобулярных белков определяется их первичной структурой. Однако весьма похожие по пространственной структуре миоглобин кашалота и леггемоглобин II желтого люпина имеют лишь 17% инвариантных аминокислот, причем три инвариантных аминокислотных остатка участвуют в обоих белках в разной системе контактов (см. рис. 1 и табл. 1). В то же время в обоих белках высок процент аминокислотных остатков, вовлеченных в образование α -спиралей (77% в миоглобине и почти 80% в леггемоглобине). По-видимому, для спиральной укладки полипептидных цепей, могущих свернуться в глобулу, наиболее важен порядок чередования полярных и неполярных аминокислот, а не индивидуальная природа остатка. Лишь в тех случаях, когда порядок чередования позволяет гидрофобным и гидрофильным остаткам распределиться на противоположных сторонах спирали, происходит слипание гидрофобных поверхностей спиралей, приводящее к свертыванию спиральных фрагментов в глобулу. Данному условию могут удовлетворять многие наборы первичных структур, что и объясняет, по-видимому, сильную «вырожденность» третичной структуры гемоглобинов, т. е. сохранение общего рисунка молекулы при большом числе индивидуальных замен.

Несмотря на однотипное свертывание полипептидных цепей в леггемоглобине и миоглобине, в деталях третичной структуры этих белков был выявлен ряд различий, из которых наиболее существенны следующие. В леггемоглобине удлинены спирали *E* и *F* и укорочены неспиральные участки, кроме участка *CD*, удлинённого на два остатка. Спираль *D* в леггемоглобине практически отсутствует. Увеличение спиральности и сокра-

щение длины неспиральных участков могло бы придать молекуле леггемоглобина ббольшую жесткость. Однако присутствие в молекуле этого белка нескольких полостей может способствовать увеличению ее конформационной подвижности. Отличительной особенностью леггемоглобина является также то, что в кластере дистального гистидина имеется большее количество остатков ароматических аминокислот, а кластер проксимального гистидина характеризуется более плотной упаковкой, чем в миоглобине. В полости гемового кармана леггемоглобина появляется вторая полярная группа (гидроксильная группа Туг H12), как в гемоглобине Glucosa [5], а функционально важный Туг H23 миоглобина заменен в леггемоглобине на остаток метионина, как в гемоглобине *Chironomus* [3]. Несомненно, что совокупность такого рода различий оказывает влияние на функционирование и свойства леггемоглобина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G., Davis D. R., Phillips D. C., Shore V. C. (1960) *Nature*, **185**, 422-427.
2. Perutz M. F., Muirhead H., Cox J. M., Goaman L. C. G. (1968) *Nature*, **219**, 131-139.
3. Huber R., Epp O., Steigemann W., Formanek H. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **19**, 42-50.
4. Hendrickson W. A., Love W. E. (1971) *Nature New Biol.*, 197-203.
5. Padlan E. A., Love W. E. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4067-4078.
6. Appleby C. A. (1974) в кн.: *The biology of nitrogen fixation* (Quispel A., ed), pp. 521-554, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
7. Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Фейгина М. Ю., Миталева С. И., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 125-128.
8. Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Фейгина М. Ю., Костецкий П. В. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 476-480.
9. Вайнштейн В. К., Арутюнян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. И., Павловский А. Г., Гребенко А. И., Копарева Н. В., Некрасов Ю. В. (1978) *Кристаллография*, **23**, 517-527.
10. Wittenberg J. B., Appleby C. A., Wittenberg B. A. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 527-531.
11. Appleby C. A., Wittenberg B. A., Wittenberg J. B. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 564-568.
12. Ellfolk N. (1961) *Acta chem. scand.*, **15**, 975-984.
13. Takano T. (1977) *J. Mol. Biol.*, **110**, 537-568.
14. Козицын С. А., Птицын О. Б. (1974) *Мол. биол.*, **8**, 536-542.
15. Perutz M. F., Teneyck L. F. (1972) *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, **36**, 295-310.
16. Takano T. (1977) *J. Biol. Chem.*, **110**, 569-584.
17. Sick H., Gersonde K., Thompson J. C., Maurer W., Haar W. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **29**, 217-223.
18. Richardson M., Dilworth M. J., Scawen M. D. (1975) *FEBS Lett.*, **51**, 33-37.
19. Vuc-Pavlovic S., Benko B., Maricic S., Lahajanar G., Kuranova I. P., Vainstein B. K. (1976) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **8**, 427-434.

Поступила в редакцию
18.VI.1979

После доработки
10.IX.1979

LEGGHEMOGLOBIN II FROM YELLOW LUPIN. THE PECULIARITIES OF ITS STRUCTURE AS COMPARED WITH SPERM WHALE MYOGLOBIN

VAINSTEIN B. K., KURANOVA I. P., HARUTYUNYAN E. G., EGOROV Ts. A.

*A. V. Shubnikov Institute of Crystallography and M. M. Shemyakin
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A comparative analysis of the tertiary structures of legghemoglobin II from yellow lupin root nodules (*Lupinus luteus* L.) and sperm whale myoglobin was carried out. The overall structures of the proteins are quite similar, differing only in some details. Among 26 invariant amino acid residues are distal E7 and proximal F8 histidines, CD1 phenylalanine and some other. All the residues, with the exception of three of them, form the same network of contacts. In legghemoglobin II the cluster which forms the microenvironment of the distal histidine includes a high percentage of aromatic amino acid residues, whereas a denser packing is characteristic of the cluster in the proximal histidine surrounding.