



УДК 577.156:548.52:548.73 p/c.f

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ*Федоров А. А., Черная М. М., Строкопытов Б. В.,
Вольнова Т. В., Жданов А. С., Горюнов А. И.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Кристаллы белка лейцинаминопептидазы из хрусталика глаза быка были выращены в капле методом диффузии паров. Для получения более крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного исследования с высоким разрешением, использовали метод кристаллизации белка в ультрацентрифуге. Пространственная группа кристаллов лейцинаминопептидазы $R6_322$; параметры ячейки a , b 132,4 Å, c 122,1 Å. Позиционные параметры двухдоменной субъединицы в кристаллографической ячейке были определены сравнением экспериментальных и расчетных структурных амплитуд. При расчете каждый из доменов аппроксимировался шаром определенного радиуса. Предполагаемое размещение двух молекул лейцинаминопептидазы на оси z кристаллической ячейки плохо согласуется с интенсивностями малоугловых рефлексов. Минимум фактора R при использовании данных 15 Å-разрешения соответствовал координатам центра большого домена (x 0,505, y 0,230, z 0,920) и малого (x 0,415, y 0,040, z 0,175). Описана модель четвертичной структуры лейцинаминопептидазы и упаковки молекул в кристаллографической ячейке.

Лейцинаминопептидаза (КФ 3.4.11.1) катализирует отщепление N-концевых аминокислот от пептидов и белков [1]. Фермент из хрусталика глаза быка имеет молекулярную массу 326 000 [2, 3] и состоит из 6 идентичных субъединиц [3, 4].

С использованием методики поперечного сшивания индивидуальных субъединиц было показано, что молекулу лейцинаминопептидазы можно представить как гексамер, состоящий из тримера димеров [4]. При этом установлено, что плоская гексагональная упаковка субъединиц невозможна [4]. Используя метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, авторы работы [5] предложили модель молекулы с октаэдрическим расположением шаровых субъединиц. Уточнение пространственной организации кристаллических агрегатов лейцинаминопептидазы по электронно-микроскопическим данным привело к модели молекулы в форме скрученной тригональной призмы или деформированного октаэдра, образованных шаровыми субъединицами [6]. Визуальная обработка электронно-микроскопических изображений отдельных молекул и микрокристаллов лейцинаминопептидазы [7] и трехмерная реконструкция молекулы фермента по ее проекциям на микрофотографиях [8] привели к модели молекулы, где 6 удлиненных субъединиц расположены по вершинам и вдоль ребер двух треугольников, лежащих в параллельных слоях и повернутых друг относительно друга на угол $\sim 30^\circ$ вокруг общей оси третьего порядка. Контакт между субъединицами, лежащими в разных слоях, осуществляется через периферийные отростки, отходящие от каждой субъединицы по направлению к центру молекулы, где они соединены попарно [8].

Предварительное рентгеноструктурное исследование было проведено для кристаллов лейцинаминопептидазы, полученных из растворов, содержащих 2-метил-2,4-пентадиол. Была установлена пространственная группа $R6_322$ и параметры элементарной ячейки a , b 132 Å, c 122 Å [9]. Электронно-микроскопическое изучение привело к предположению о двухдоменной структуре отдельной субъединицы лейцинаминопептидазы [10] и к модели молекулы, напоминающей известную модель аспартаттранскарбамиллазы [11, 12]. Это сходство между молекулами обоих ферментов имеет место и в случае модели лейцинаминопептидазы, предложенной в работах [7, 8].

Одной из целей данной работы было получение крупных кристаллов лейцинаминопептидазы, пригодных для рентгеноструктурного исследования. Препараты лейцинаминопептидазы из хрусталика глаза быка были любезно предоставлены нам д-ром Л. Ван Лун и проф. Г. Блюмендалем (Голландия).

Микрокристаллы белка до 0,3 мм были получены методом диализа из растворов, содержащих сульфат аммония [13, 14]. Крупные кристаллы

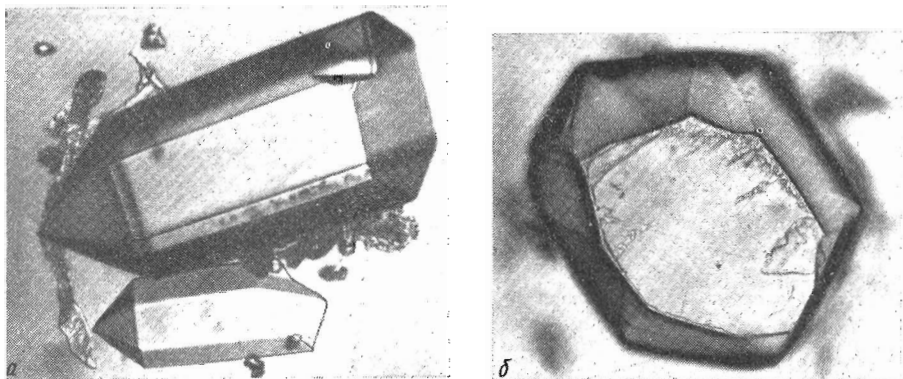


Рис. 1. Кристаллы лейцинаминопептидазы, выращенные кристаллизацией в капле методом диффузии паров (а) и в центрифуге (б)

были выращены методом диффузии паров из водного 45% раствора 2-метил-2,4-пентандиола [9]. Выращенные таким способом кристаллы вследствие малой устойчивости к радиации не использовались для определения трехмерной структуры фермента [9]. Крупные, совершенные кристаллы лейцинаминопептидазы были получены из раствора, содержащего 3 мг/мл белка, 50 мМ трис- H_2SO_4 (pH 7,8), 0,02 мМ ZnSO_4 и 0,2 М Li_2SO_4 . Каплю раствора (10 мкл) помещали на силиконированное стеклышко в герметично закрытом стаканчике, содержащем 1 мл 1 М Li_2SO_4 . Через 2–3 недели в капле при комнатной температуре вырастали 1–3 кристалла величиной 0,3×0,3×0,7 мм (рис. 1а). Эти кристаллы устойчивы в рентгеновском пучке приблизительно 40 ч. Однако поскольку размеры элементарной ячейки велики, то при указанных размерах кристаллов интенсивность дифракционной картины была невысокой.

В дальнейшем мы использовали метод кристаллизации белков в центрифуге [15], сохранив ранее найденные нами условия кристаллизации. Этот метод позволяет быстро (за 24 ч) получать крупные кристаллы. В прозрачные центрифужные пробирки помещали по 10 мл очищенного от механических примесей раствора, содержащего 1–1,2 мг лейцинаминопептидазы, 50 мМ трис- H_2SO_4 (pH 7,8), 0,02 мМ ZnSO_4 , 0,3 М Li_2SO_4 . Затем раствор центрифугировали 24 ч со скоростью 20 000 об/мин при 17° С. При этом на стенке пробирки у дна выросло от 10 до 20 кристаллов размером 0,35×0,7×1 мм (рис. 1б).

Благодаря большим размерам кристаллы лейцинаминопептидазы, полученные в центрифуге, дают дифракционное поле, позволяющее определять структуру с разрешением 3,0 Å (рис. 2а, б), в то время как кристаллы, полученные в капле, показывают дифракционную картину, соответствующую лишь разрешению порядка 4,5 Å. Полученные кристаллы лейцинаминопептидазы были подвергнуты предварительному рентгенографическому исследованию. На рис. 2а, б приведены прецессионные рентгенограммы плоскостей обратной решетки $hk0$ (а) и $h0l$ (б). Параметры гексагональной элементарной ячейки и пространственная группа кристаллов лейцинаминопептидазы, выращенных в капле методом диффузии паров и в центрифуге, совпали с соответствующими параметрами кристаллов белка, полученных из растворов с органическим осадителем [9]. Однако

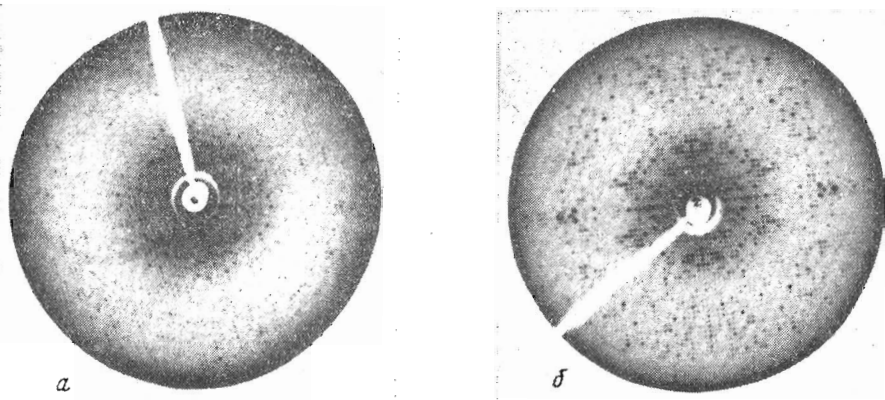


Рис. 2. Рентгенограммы слоевых плоскостей $hk0$ (а) и $h0l$ (б) кристалла лейцинаминопептидазы. Экспозиция 20 ч, μ 15° , расстояние кристалл — пленка 75 мм

пространственная группа $P6_322$, установленная рентгеновскими методами, не совпадает с пространственными группами, предложенными для лейцинаминопептидазы при электронно-микроскопических исследованиях микрокристаллов [6, 7].

Форма, позиционные параметры и упаковка молекул в кристалле

Исследуемая нами кристаллическая форма лейцинаминопептидазы содержит две молекулы белка в элементарной ячейке, т. е. на независимую часть ячейки приходится субъединица весом 54 000 [9]. Электронно-микроскопические исследования лейцинаминопептидазы однозначно указывают на точечную группу симметрии молекулы 32 [6—8, 10]. Следовательно, центр молекулы фермента должен занимать одну из четырех позиций с указанной точечной группой симметрии, имеющих в пространственной группе $P6_322$ [16]. Две из этих позиций, a, b , расположены на винтовой оси шестого порядка, две другие, c, d , — на тройных поворотных осях. Представляло интерес на начальной стадии исследования сделать выбор между возможными вариантами расположения молекул в кристаллографической ячейке путем сравнения экспериментальных и расчетных интенсивностей.

Рентгеновские трехмерные дифракционные данные низкого разрешения для кристалла нативного белка (150 независимых рефлексов), соответствующие разрешению 15 Å, были получены на дифрактометре САД-4 (Enraf Nonius, Голландия). На основе результатов электронно-микроскопических исследований [10] отдельная субъединица фермента считалась состоящей из двух шаровых доменов с радиусами 20 и 10 Å соответственно. Структурный фактор такого шара с однородным распределением плотности внутри него рассчитывали как

$$f = \frac{3,0 (\sin(2\pi Hr) - (2\pi Hr) \cos(2\pi Hr))}{(2\pi Hr)^3}$$

Сначала был проведен поиск примерных позиций только большего домена вследствие его доминирующего вклада в суммарную структурную амплитуду. Все расчеты проводились с помощью специальной программы, написанной на ФОРТРАНе и поставленной на ЭВМ СДС-6500. Координаты каждого отдельного положения домена размножались кратностью общей позиции данной пространственной группы. При этом для всех рефлексов hkl расчетные модули структурных амплитуд сравнивались с экспериментальными величинами с помощью фактора R :

$$R = \frac{\sum_{hkl} |k| |F_{\text{эксп}}| - |F_{\text{расч}}|}{\sum_{hkl} |k| |F_{\text{эксп}}|}$$

**Координаты центров двух доменов субъединицы молекулы
лейцинаминопептидазы в кристаллографической ячейке**

	x	y	z	Радиус, Å
Энантиоморф 1				
Домен 1	0,505	0,230	0,920	22
Домен 2	0,415	0,040	0,175	10
Энантиоморф 2				
Домен 1	0,505	0,230	0,580	22
Домен 2	0,415	0,040	0,325	10

где коэффициент шкалирования экспериментальных и расчетных модулей определяется как

$$k = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{расч}}|}{\sum_{hkl} |F_{\text{эксп}}|}$$

Уже на первой стадии расчетов все значения факторов R в случае локализации однодоменных субъединиц молекулы вблизи винтовой оси шестого порядка на 40–50% и более превышали значения R , отвечающие расположению центра молекулы на оси симметрии третьего порядка. Последняя область была просканирована при одновременном варьировании координат обоих доменов. Невозможность расположения молекул лейцинаминопептидазы на винтовой оси шестого порядка согласуется с данными электронных микрофотографий тонких кристаллических срезов [10]. В таблице указаны уточненные координаты центров большого и малого доменов двух возможных энантиоморфов, соответствующие минимуму фактора R 36%.

Представленные координаты соответствуют следующим положениям центров двух гексамерных молекул ячейки: $1/3, 2/3, 1/4$ и $2/3, 1/3, 3/4$. Надо отметить, что подключение малого домена понизило величину фактора R в точке глобального минимума лишь на 10% по сравнению с минимумом, найденным при однодоменном поиске. На рис. 3а, б показана кристаллическая упаковка молекул, полученная по указанным в таблице координатам субъединичных доменов.

Как видно из рис. 3а, б, оптимальная сборка гексамерной молекулы из двухдоменных субъединиц может быть сделана лишь единственным способом. Структура молекулы лейцинаминопептидазы, полученная в результате позиционного поиска двухдоменной субъединицы по данным низкого разрешения, в значительной степени напоминает структуру аспартаттранскарбамилазы [11, 12], что хорошо согласуется с результатами электронно-микроскопических исследований фермента [7, 8, 10]. Большие домены каждой из шести субъединиц молекулы лейцинаминопептидазы расположены в вершинах оснований тригональной призмы. Верхнее и нижнее основания, имеющие вид внутренних треугольников, повернуты друг относительно друга на $\sim 16^\circ$ вокруг общей тройной оси; найденную величину угла следует считать лишь предварительным результатом, так как фактор R для такого расположения лишь на 2–3% отличается от фактора R , соответствующего полностью заслоненному положению больших доменов. Внешний треугольник, если смотреть вдоль оси, образован малыми доменами каждой из шести субъединиц. Для сравнения следует указать, что относительный разворот внутренних треугольников в молекуле лейцинаминопептидазы, согласно работам [6–8], составляет $\sim 30^\circ$, а модель лейцинаминопептидазы, предложенная в работе [10], соответствует полностью заслоненному положению внутренних треугольников, как это имеет место в молекуле аспартаттранскарбамилазы [17]. Использование шаровой аппроксимации формы малого домена объясняется лишь удобствами в расчетах; в работе [10] для малого домена предложена более сложная

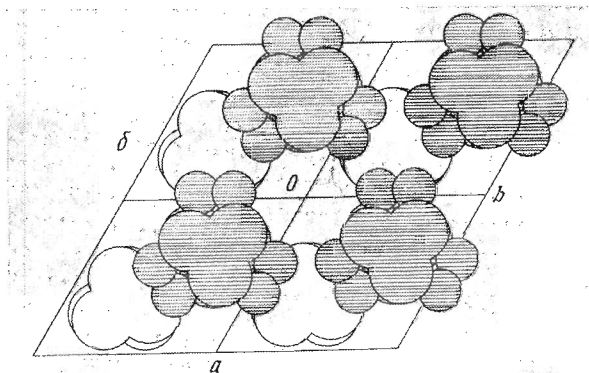
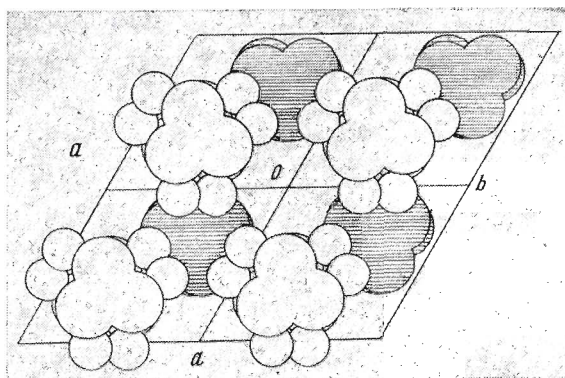


Рис. 3. Два слоя (*a*, *б*) упаковки молекул лейцинаминопептидазы в кристалле. Заштрихованные и незаштрихованные молекулы имеют относительный сдвиг 60 \AA вдоль оси *c* кристалла. У нижележащих молекул малые домены не указаны

конфигурация, ведущая к остроконечному виду внешнего треугольника. В нашем случае внешний треугольник имеет срезанные вершины (рис. 3*a*, *б*), что согласуется с внешним видом электронных микрофотографий [7, 8]. Собственные элементы симметрии молекулы лейцинаминопептидазы (тройная ось и три перпендикулярные ей двойные оси) совпадают с элементами симметрии кристаллографической ячейки (рис. 3*a*, *б*). В плоскости, перпендикулярной оси третьего порядка, габаритный размер молекулы $\sim 116 \text{ \AA}$ равен расстоянию между проекциями на эту плоскость двух крайних точек наиболее удаленных малых доменов. Габаритный размер молекулы $\sim 84 \text{ \AA}$ вдоль оси третьего порядка равен расстоянию между проекциями на эту ось двух крайних точек больших доменов, принадлежащих верхнему и нижнему основанию тригональной призмы. Расположенные в пределах одного основания большие домены трех субъединиц контактируют между собой, образуя гетерологические связи [18]. Большие домены, расположенные в разных слоях, также контактируют между собой, образуя изологические пары [18]. Последний результат не совпадает с данными, полученными при трехмерной реконструкции молекулы лейцинаминопептидазы [8]; там расстояние между белковыми плотностями, отвечающими большим доменам разных слоев, равно 15 \AA . Малые домены каждой пары субъединиц разных слоев, большие домены которых повернуты друг относительно друга на $\sim 104^\circ$, контактируют между собой в вершинах внешних треугольников с образованием изологической связи (рис. 3*a*, *б*).

В кристалле вдоль винтовых осей шестого порядка расположены заполненные растворителем широкие каналы диаметром 65 \AA . Ажурная трехмерная упаковка молекул лейцинаминопептидазы в кристалле осуществляется за счет взаимных контактов малого домена одной молекулы с боль-

шим доменом соседней молекулы, связанной с первой двойной винтовой осью (рис. 3а, б). Каналы с растворителем, протянувшиеся вдоль оси с гексагональной ячейки, связаны между собой поперечными областями высотой ~ 40 Å, расположенными сверху и снизу любой из молекул в кристалле. Кристаллическая упаковка молекул лейцинаминопептидазы (рис. 3а, б), полученная при сравнении экспериментальных и расчетных рентгеновских интенсивностей, хорошо согласуется с упаковкой, предложенной на основе анализа электронных микрофотографий тонких кристаллических срезов [10]. Конечно, детали внутри- и межмолекулярных взаимодействий в кристалле, а также тонкая структура субъединиц молекулы лейцинаминопептидазы будут в дальнейшем уточнены в ходе исследования структуры фермента методом полизоморфного замещения, которое в настоящее время проводится с использованием найденных нами тяжелоатомных производных.

Мы благодарны д-ру Л. Ван Луи и проф. Г. Блюмендалю (Голландия) за предоставленные препараты лейцинаминопептидазы, проф. Н. С. Андреевой за постоянное внимание и ценные замечания, сотрудникам лаборатории структурного анализа Института белка АН СССР за большую помощь в рентгеновском эксперименте.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hanson H., Frohne M.* Methods Enzymol., 1977, v. XLY, p. 504–521.
2. *Kretschmer K., Hanson H.* Z. Physiol. Chem., 1965, B. 340, H. 3–6, S. 126–137.
3. *Melbye S. W., Carpenter F. H. J.* Biol. Chem., 1971, v. 246, № 8, p. 2459–2463.
4. *Carpenter F. H., Harrington K. T.* J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 17, p. 5580–5586.
5. *Damashun G., Damashun H., Hanson H., Muller J. J., Puschel H. V.* Studia biophys., 1973, B. 35, H. 1, S. 59–60.
6. *Вангерман Г., Единцов И. М., Ивануцкий Г. Р., Купиский А. С., Рейхельт Р., Цыганов М. А.* Биофизика, 1977, т. 22, вып. 4, с. 599–604.
7. *Kiselev N. A., Stel'maschuk V. Ya., Tsuprun V. L., Ludewig M., Hanson H. J.* Mol. Biol., 1977, v. 115, № 1, p. 33–43.
8. *Цупрун В. Л., Киселев Н. А., Вайнштейн Б. К.* Кристаллография, 1978, т. 23, вып. 4, с. 743–748.
9. *Jurnak F., Rich A., van Loon-Klaassen L., Bloemendal H., Taylor A., Carpenter F. H.* J. Mol. Biol., 1977, v. 112, № 1, p. 149–153.
10. *Taylor A., Carpenter F. H., Wlodawer A. J.* Ultrastructure Res., 1979, v. 68, № 1, p. 92–100.
11. *Richards K. E., Williams R. C.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 18, p. 3393–3395.
12. *Evans D. R., Warren S. G., Edwards B. F. P., McMurray C. H., Bethge P. H., Wiley D. C., Lipscomb W. N.* Science, 1973, v. 179, № 4074, p. 683–685.
13. *Hanson H., Glasser D., Kirckhe H.* Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem., 1965, B. 340, H. 3–6, S. 107–125.
14. *Glässer D., Kettmann U., Hanson H.* Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem., 1970, B. 351, H. 11, S. 1329–1336.
15. *Карпухина С. Я., Барынин В. В., Лобанова Г. М.* Кристаллография, 1975, т. 20, вып. 3, с. 680–681.
16. International Tables for X-ray Crystallography, 1969, v. 1, p. 289.
17. *Monaco H. L., Crawford J. L., Lipscomb W. N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 11, p. 5276–5280.
18. *Monod J., Wyman J., Changeux J. P.* J. Mol. Biol., 1965, v. 12, p. 88–106.

Поступила в редакцию
9.IV.1982

PRELIMINARY X-RAY STUDY OF LEUCINE AMINOPEPTIDASE

FEDOROV A. A., CHERNAYA M. M., STROKOPYTOV B. V.,
VOLNOVA T. V., ZDANOV A. S., GORYUNOV A. I.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Crystals of leucine aminopeptidase from bovine lens were grown on concentrating a protein solution by vapour diffusion. A centrifuge method was used to obtain large crystals suitable for high resolution analysis. The crystals have space group $P6_322$, with cell dimensions a , b 132.4 Å and c 122.1 Å. The position of bilobal subunits in the crystallographic cell has been determined by application of residual calculations based on a solid-sphere model. All models placing two molecules on Z axis poorly predicted the low-order intensities. With full 15 Å X -ray data, the lowest residual value is at x 0,505, y 0,230, z 0,920 for the center of a principal lobe and x 0,415, y 0,040, z 0,175 for the center of a minor lobe. The quaternary structure of leucine aminopeptidase and its crystal packing based on residual calculation have been described.