



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.088.3]

© 1991 г.

С. Ф. Барбашов, Ц. А. Егоров, В. М. Кочкина

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ИЗ СОЕВЫХ БОБОВ

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва

К настоящему моменту изучен лишь один инсулинсвязывающий белок — рецептор инсулина, локализованный на плазматической мембране клетки [1]. Этот белок и ген, кодирующий его, всесторонне изучены для различных тканей. Для рецептора инсулина известна субъединичная структура и полная аминокислотная последовательность [2, 3].

Нами была предпринята попытка выделить инсулинсвязывающий белок растительного происхождения. В качестве источника использовали пророщенные соевые бобы, кислый экстракт которых после нескольких стадий подвергали аффинной хроматографии на инсулин-сефарозе. Снятый с аффинной колонки материал дробным высаливанием сульфатом аммония был поделен на две части, каждая из которых представляла собой практически гомогенный белок. В первой, получаемой при 30%-ном насыщении сульфата аммония, находился белок, названный si30, во второй, получаемой при 60%-ном насыщении, — белок, названный si60.

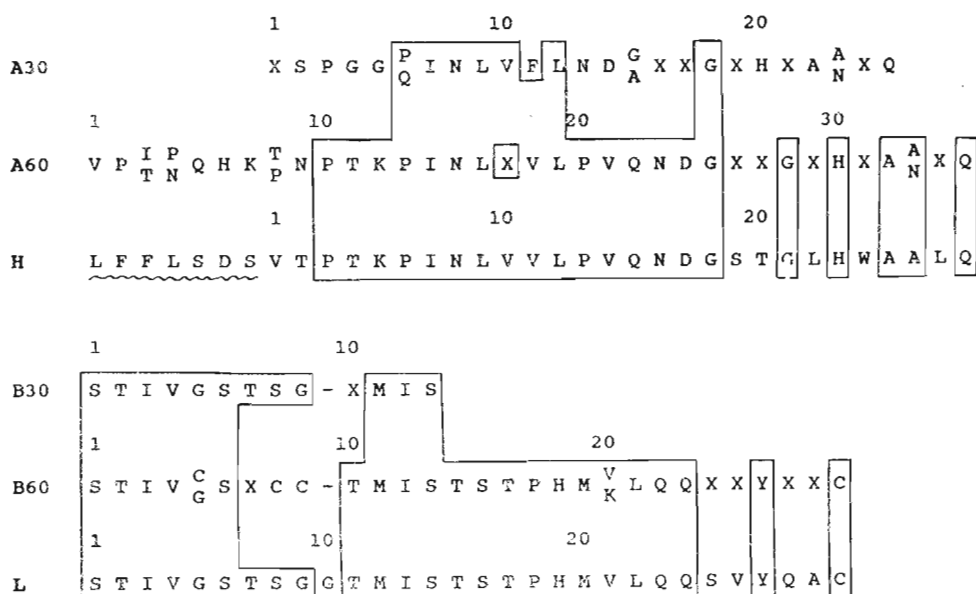
При электрофорезе в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия оба белка обладали одинаковой подвижностью, соответствующей кажущейся молекулярной массе около 39 000. После обработки β -меркаптоэтанолом каждый из белков распадался на две цепи — легкую и тяжелую с кажущимися молекулярными массами около 17 000 и 25 000.

Чтобы выяснить, связывают ли полученные в настоящей работе белки и составляющие их субъединицы бычий инсулин, последний был помечен ^{125}I [4]; меченый инсулин и нитроцеллюлозную бумагу, на которую с полиакриламидного геля были перенесены соответствующие образцы, инкубировали в буфере связывания [5]. После отмывок и сушки бумагу подвергали автордиографии, результаты которой однозначно свидетельствовали о том, что оба выделенных из соевых бобов белка (si30 и si60), а также их легкие и тяжелые полипептидные цепи связывают меченый инсулин.

Последнее свойство принципиально отличает полученные белки от рецептора инсулина. Субъединицы последнего также соединены друг с другом дисульфидными мостиками. Однако лишь две из них (α -субъединицы) выполняют роль связывания инсулина. Другие две (β -субъединицы) выполняют иную функцию.

В отличие от белка si60 белок si30 оказался нерастворимым в низко-солевых водных буферах со значениями pH, близкими к нейтральному. Это свойство сделало удобным определение константы связывания находящегося в суспензии белка si30 с инсулином, так как в случае использования для этого инсулина, меченного тем или иным способом, разделение связанной и свободной форм инсулина легко произвести центрифугированием.

Расчет константы связывания инсулинсвязывающего белка si30 с ^{125}I инсулином проводили в координатах Скэтчарда. Вычисленное зна-



N-Концевые аминокислотные последовательности субъединиц инсулинсвязывающих белков si30 и si60 и 7S-глобулина соевых бобов: A30 — тяжелая цепь белка si30; A60 — тяжелая цепь белка si60; H — тяжелая цепь 7S-глобулина (согласно [6]); B30 — легкая цепь белка si30; B60 — легкая цепь белка si60; L — легкая цепь 7S-глобулина (согласно [6]). Совпадающие по ходу последовательностей аминокислотные остатки заключены в рамки. Волнистой линией подчеркнуты кодируемые ДНК аминокислоты предполагаемого сигнального пептида тяжелой цепи 7S-глобулина

чение константы диссоциации ($4 \cdot 10^{-9}$ М) свидетельствует о специфичности изучаемого взаимодействия.

Для структурных исследований окончательную очистку изучаемых белков и их полипептидных цепей осуществляли обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила на колонке Aquapore RP-300 (Brownlee Labs, США). По аминокислотному составу белки si30 и si60 оказались схожи с охарактеризованным на уровне последовательности кДНК вариантом 7S-глобулина сои [6], имеющим близкое значение молекулярной массы и аналогичное субъединичное строение [7]. Для всех трех сравниваемых белков различия сводятся в основном к содержанию гидроксаминкислот и цистеина.

Результаты спектрофотометрического титрования при помощи 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоата) [8] показали, что нативные и денатурированные инсулинсвязывающие белки сои не содержат в своем составе тиоловых групп.

Было проведено сравнение N-концевых последовательностей тяжелых и легких цепей белков si30 и si60, определенных посредством автоматического секвенирования по Эдману (рисунок), с выведенными из нуклеотидной последовательности ДНК аминокислотными последовательностями цепей 7S-глобулина сои [6]. Несмотря на значительную гомологию последовательностей, соотносимые полипептиды не идентичны. В частности, тяжелая цепь белка si60 содержит с N-конца на 7 аминокислотных остатков больше по сравнению с тяжелыми цепями как белка si30, так и 7S-глобулина, причем ни один из них по положению не совпадает с соответствующими остатками кодируемого кДНК 7S-глобулина сигнального пептида. Для легких цепей белков si30 и si60 характерна делеция 10-го аминокислотного остатка по сравнению с легкой цепью 7S-глобулина. Кроме того, результаты секвенирования обнаружили гетерогенность как легких, так и тяжелых цепей, что свидетельствует о существовании нескольких гомологичных последовательностей.

В целом полученная картина с учетом сходства аминокислотных составов не оставляет сомнений в том, что исследуемые белки — варианты

7S-глобулина сои, одного из гликопротеидов, активно синтезируемых в семядолях при прорастании бобов сои [7].

Анализ содержания сахаров фенол-серноокислотным методом [9] показал, однако, что в отличие от 7S-глобулина сои исследуемые белки лишены углеводных цепей.

Основное свойство изученных в настоящей работе белков — способность связывать инсулин — позволяет предполагать, что в растениях существует система регуляции метаболизма сходными с инсулином полипептидами, в которой участвуют соответствующие связывающие белки. С этим предположением согласуется тот факт, что в растительных и бактериальных объектах обнаружены белки, иммунореактивные по отношению к антителам к инсулину [10].

Полученные нами результаты не позволяют судить ни о внутриклеточной локализации, ни, тем более, о механизме функционирования исследованных белков. Однако наличие гомогенных растительных инсулин-связывающих белков открывает возможности для выделения и изучения свойств инсулиноподобных регуляторных белков растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Meyts P., Bianco A. R., Roth J.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 7. P. 1877—1888.
2. *Hedo J. A., Simpson I. A.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 17. P. 11083—11089.
3. *Ultrich A., Bell J. R., Cien E. Y., Herrera P., Petruzzelli L. M., Dull T. J., Gray A., Coussens L., Liao Y. C., Rosen P. M., Ramachandran J.* // *Nature.* 1985. V. 313. № 6005. P. 756—761.
4. *Greenwood F. C., Hunter W. M., Clover J. C.* // *J. Biochem.* 1963. V. 89. P. 114—125.
5. *Hossenlopp P., Seurin D., Segovia-Quinson B., Hardouin S., Binoux M.* // *Anal. Biochem.* 1986. V. 154. № 1. P. 138—143.
6. *Kagawa H., Hirano H.* // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 21. P. 8868.
7. *Kagawa H., Yamauchi F., Hirano H.* // *FEBS Lett.* 1987. V. 226. № 1. P. 145—152.
8. *Ellman G. L.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1959. V. 82. P. 70—77.
9. *Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.* // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. № 3. P. 350—356.
10. *Leroith D., Shiloach J., Heferon R., Rubinovitz C., Tanenbaum R., Roth J.* // *Can. J. Biochem. and Cell Biol.* 1985. V. 63. № 8. P. 839—849.

Поступило в редакцию
23.VII.1990

S. F. BARBASHOV, Ts. A. EGOROV, V. M. KOCHKINA

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOYBEAN INSULIN-BINDING PROTEINS

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Two soybean insulin-binding proteins were isolated using affinity chromatography on insulin-Sepharose. Both proteins have molecular mass about 39 kDa and consist of two subunits linked by disulphide bonds. According to the amino acid composition and N-terminal sequences of the subunits, these proteins, characterized by the absence of free thiol groups and sugar residues, are variants of the previously described soybean basic 7S globulin. The blotted proteins as well as their subunits were shown to bind ^{125}I -labelled bovine insulin. For one of the proteins and insulin, dissociation constant of $4 \cdot 10^{-9}$ M was measured. The existence of plant insulin-binding proteins suggests the insulin-like regulation in the plant metabolism.