



УДК 577.152.342'.22.042

© 1994 Т. А. Валуева, Л. И. Григорьева,
Ле Тхи Фу*, Н. А. Потапенко**, Т. Е. Ковалевич*,
Во Хонг Ньян*, В. В. Мосолов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕВОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА (ИНГИБИТОР КУНИТЦА) С ЦИСТЕИНОВЫМИ ПРОТЕИНАЗАМИ

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва;
*Институт экспериментальной биологии НЦНИ СРВ, Хошимин;
**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: соевый ингибитор протеиназ; *Carica papaya*, протеиназы.

Исследовано взаимодействие цистеиновых протеиназ из млечного сока дынного дерева (*Carica papaya* L.) с иммобилизованным в полиакриламидном геле соевым ингибитором трипсина (ингибитор Кунитца). Показано, что в растворах с низкой ионной силой только один из ферментов латекса образует устойчивый комплекс с иммобилизованным ингибитором. Комплекс диссоциирует в мягких условиях с освобождением активной протеиназы. Результаты определения физико-химических свойств, аминокислотного состава, а также N- и C-концевых аминокислотных последовательностей свидетельствуют о том, что фермент, связывающийся с иммобилизованным ингибитором Кунитца, является протеиназой Ω папайи.

Белковые ингибиторы протеолитических ферментов характеризуются высокой специфичностью. Как правило, их действие строго направлено на подавление активности ферментов одного класса. Так, ингибиторы сериновых протеиназ обычно не обнаруживают способности ингибировать цистеиновые, аспартильные и металлопротеиназы [1]. Это справедливо и для ингибиторов других классов пептидгидролаз. Более того, действие ингибиторов может быть еще более ограничено, так что в пределах одного класса протеиназ они способны подавлять активность только тех ферментов, которые обладают близкой субстратной специфичностью [2].

Однако ранее было показано, что классический ингибитор сериновых протеиназ — соевый ингибитор трипсина (ингибитор Кунитца, СТИ) — может оказывать ингибирующее действие на клострипаин, цистеиновую протеиназу из *Clostridium histolyticum* (КФ 3.4.22.8) [3]. В связи с этим настоящая работа посвящена изучению взаимодействия цистеиновых протеиназ из млечного сока плодов дынного дерева (*Carica papaya* L., КФ 3.4.22.2) с иммобилизованным СТИ.

Водорастворимые белки латекса в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,0, предварительно активировали цистеином и наносили на колонку с иммобилизованным

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 93-04-7788).

Сокращения: СТИ — соевый ингибитор трипсина.

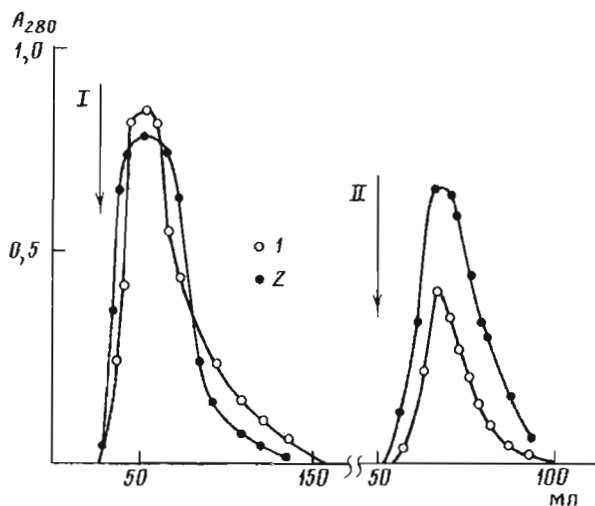


Рис. 1. Хроматография водорастворимых белков латекса дынного дерева на колонке с иммобилизованным СТИ. Колонка уравновешена 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,0, элюция тем же буфером (1) и им же с добавлением 0,2 М NaCl (II). 1 — A_{280} , 2 — протеолитическая активность (субстрат — казеин)

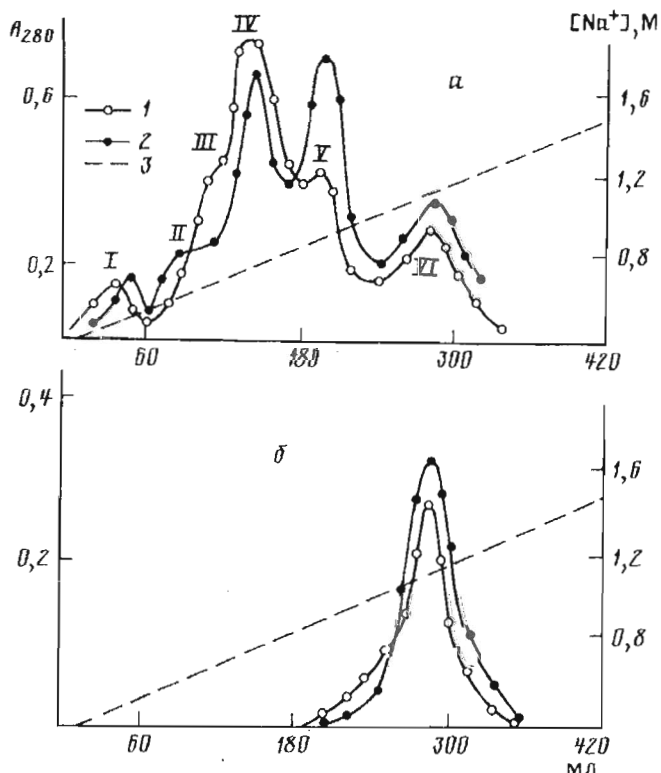


Рис. 2. Хроматография цистеиновых протеиназ латекса дынного дерева на СМ-сефадексе С-50 в стандартных условиях (см. «Экспер. часть»). а — водорастворимые белки латекса, б — белок, выделенный с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном СТИ (фракция, элюирующаяся буфером II, рис. 1). 1 — A_{280} , 2 — протеолитическая активность, 3 — концентрация элюирующего буфера $[Na^+]$

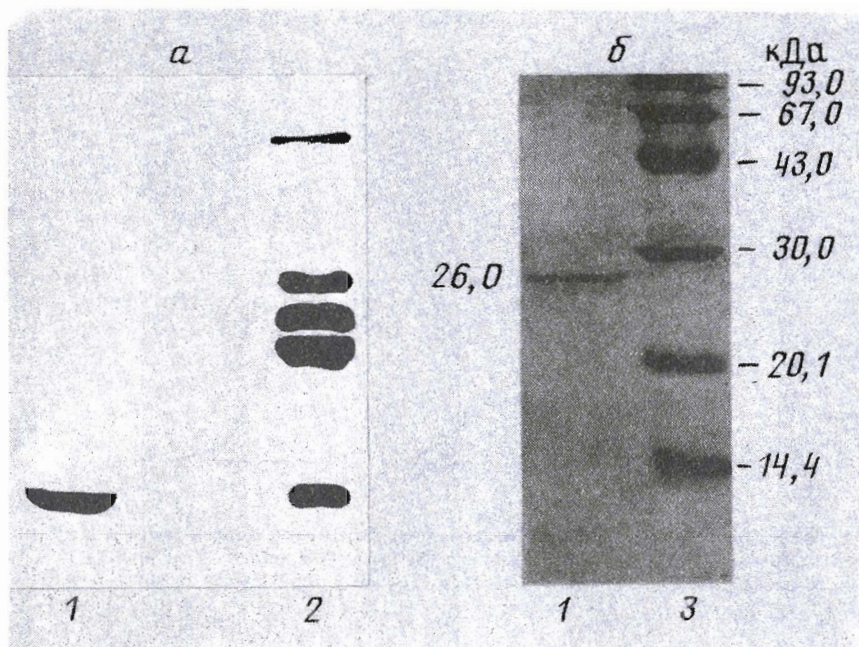


Рис. 3. PAGE при pH 4,3 (а) и SDS-PAGE (б) цистеиновых протеиназ из латекса дынного дерева. 1 — белок, связывающийся на колонке с иммобилизованным СТИ (см. рис. 1), 2 — водорастворимый белок латекса, 3 — белки-маркеры (сверху вниз: фосфорилаза в, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, карбангидраза, СТИ, лактальбумин). Перед нанесением на гель ферменты инактивировали иодацетатом натрия

СТИ (рис. 1). Значительная часть активного материала элюировалась стартовым буфером. Однако некоторое количество нанесенного белка, также обладающее протеолитической активностью, связывалось с иммобилизованным ингибитором и элюировалось только при увеличении ионной силы раствора (0,2 М NaCl). Общее количество белка, связавшегося на колонке с иммобилизованным ингибитором, рассчитывали на основании оптического поглощения элюата, принимая за основу величину $A_{280}^{1\%} = 1,83$ для химопапаина и протеиназы Ω папайи [4]. Определенная таким образом способность иммобилизованного СТИ присоединять ферменты латекса составила 0,024 мкмоль белка/мл геля, или 21,8% соответствующей величины для трипсина и 70,1% для химотрипсина (см. «Экспериментальную часть»). Этот результат согласуется с представлением о том, что одни и те же группы иммобилизованного ингибитора ответственны за взаимодействие с трипсином, химотрипсином и белками латекса папайи [5, 6].

Водорастворимые белки латекса папайи при ионообменной хроматографии на колонке с CM-сефадексом С-50 при pH 5,0 в условиях, принятых для фракционирования ферментов латекса папайи [7], разделяются на шесть белковых компонентов, обладающих протеолитической активностью (рис. 2а). Эти компоненты, согласно литературным данным [7—9], могут быть идентифицированы как папаин (компоненты I и II), ферменты группы химопапаина (компоненты IV и V) и протеиназа Ω папайи (компонент VI, который элюируется с ионообменника последним при концентрации ионов натрия 1,1 М).

Белок, связывающийся с иммобилизованным СТИ, подвергали ионообменной хроматографии на колонке с CM-сефадексом С-50 в описанных выше условиях (рис. 2б). Активный материал в этих условиях элюировался с ионообменника в виде одного белкового компонента при концентрации ионов натрия, равной 1,1 М, т. е. в условиях, совпадающих с условиями элюции протеиназы Ω папайи.

Небольшое количество материала, не обладающего протеолитической активностью, не задерживалось на катионите и элюировалось стартовым буфером

Таблица 1

Кинетика освобождения аминокислот после действия карбоксипептидазы А на протеиназу, выделенную из латекса папайи (моль/моль белка)

Аминокислота	Длительность инкубации, мин		
	10	30	120
Asn*	0,18	0,43	0,86
Lys	0,09	0,35	0,69
Thr	0,04	0,28	0,53

* Идентифицирована после дансирования гидролизата с помощью ТСХ на закрепленном слое силикагеля [11].

Таблица 2

Аминокислотный состав протеиназы, выделенной из латекса папайи

Аминокислота	Белок	Протеиназа Ω [9]
Asp	12,56(13)	13
Thr	9,31(9)	9
Ser	14,11(14)	14
Glu	18,25(18)	18
Pro	13,10(13)	13
Gly	30,90(31)	31
Ala	13,65(14)	14
1/2 Cys*	6,64(7)	7
Val	19,62(20)	20
Met*	0	0
Ile	9,99(10)	10
Leu	11,03(11)	11
Тыр**	11,50(12)	12
Phe	2,90(3)	3
His	3,72(4)	4
Lys	22,12(22)	22
Arg	10,62(11)	11
Trp	Не определяли	4
Общее количество остатков	212	216

*Определяли после окисления белка надмуравьиной кислотой.

**Рассчитывали экстраполяцией к нулевому времени гидролиза.

до начала градиента. По-видимому, материал, не сорбирующийся на колонке с СМ-сефадексом С-50, представляет собой низкомолекулярные продукты автолитической деградации, образующиеся в процессе аффинной хроматографии белка на иммобилизованном СТИ.

Реактивом Элмана в выделенном белке титруется $0,95 \pm 0,10$ моль свободных SH-групп на 1 моль белка как после активации протеиназы L-цистеином, так и без предварительной обработки активатором. Это свидетельствует о наличии

Экспериментальная часть

В работе использовали сефадекс G-75, CM-сефадекс C-50 и наборы «низкомолекулярных» белков-маркеров (Pharmacia, Швеция), L-цистеин (гидрохлорид), EDTA (Na-соль) и реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле (Reanal, Венгрия), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (Serva, Германия), PVDF-мембрану — Immobilon (Millipore, США), реактивы для секвенирования фирмы Applied Biosystems (США). Препарат соевого ингибитора трипсина (Reanal, Венгрия) дополнительно очищали с применением метода аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе и последующей гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-75 для отделения примеси низкомолекулярных ингибиторов трипсина и химотрипсина.

В качестве источника цистеиновых протеиназ использовали свежесамороженный латекс из незрелых плодов дынного дерева, произрастающего во Вьетнаме (Хошимин). Водорастворимые белки получали после растирания латекса в ступке с песком с постепенным добавлением воды до конечного соотношения 1:10 (вес/объем). Суспензию диализовали против деминерализованной воды при 4° С, фильтровали и фильтрат лиофильно высушивали.

Иммобилизованный СТИ получали предварительным ацилированием белка хлорангидридом акриловой кислоты и последующей сополимеризацией с акриламидом в присутствии N,N'-метиленабисакриламида [12]. Количество белка, включенного в гель, достигало 5 мг/мл. Активность иммобилизованного СТИ, определенная по способности связывать трипсин, составляла 0,11 мкмоль активного ингибитора на 1 мл геля. В то же время иммобилизованный СТИ связывал лишь 0,034 мкмоль химотрипсина на 1 мл геля.

Аффинную хроматографию проводили с помощью «batch»-процедуры, перемешивая суспензию 50 мл геля, содержащего иммобилизованный СТИ, в растворе 45 мг водорастворимых белков латекса в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,0, с помощью механической мешалки в течение 30 мин. Затем суспензию переносили в стеклянную колонку, колонку с гелем промывали тем же буфером и затем 0,2 М NaCl в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,0 (рис. 1).

Ионообменную хроматографию осуществляли на CM-сефадексе C-50, используя колонку размером 1,0×17,0 см. Образцы белка и гель уравнивали 0,4 М натрий-ацетатным буфером, pH 5,0. Несвязавшийся материал элюировали исходным буфером, а затем элюцию проводили линейным градиентом повышающейся концентрации натрий-ацетатного буфера, pH 5,0, от 0,4 до 1,5 М. Скорость элюирования 6 мл/ч, объем фракций 6 мл.

Протеолитическую активность определяли по методу Кунитца, модифицированному для папаина (субстрат — 1% казеин) [13]. В качестве активаторов использовали L-цистеин и EDTA (Na₂-соль) в конечной концентрации 5 и 2 мМ.

Электрофорез в 15% полиакриламидном геле (PAGE) проводили, используя β-аланиновую систему (pH 4,3) [7], а также в присутствии 0,1% SDS и β-меркаптоэтанола (SDS-PAGE) [14]. Гели окрашивали кумасси G-250. Перед нанесением на гель ферменты инактивировали иодацетатом натрия.

Для проведения электроблоттинга [15] окрашенный после SDS-PAGE гель вымачивали 5 мин в 0,1 М боратном буфере, pH 9,2, и накладывали на бумагу Whatman 3MM, смоченную тем же буфером. Сверху на гель помещали смоченную в буфере PVDF-мембрану и далее вновь лист бумаги. Электроблоттинг проводили с помощью прибора Megit (LKB, Швеция) в течение 2 ч при силе тока 200 мА [15]. В результате электроблоттинга с гелевой пластины было переведено до 80% общего количества белка.

Секвенирование белка осуществляли на газофазовом секвенаторе 470 A (Applied Biosystems, США) [16]. Узкие полоски PVDF-мембраны (1—2 мм) с перенесенным белком укладывали на тефлоновую подложку в реакционной камере секвенатора, высушивали 10—15 мин и секвенировали по стандартной программе 02 RPTH. Идентифицировали Pth-производные аминокислот методом высокоэффективной хроматографии. Фракции с раствором Pth-производных аминокислот упаривали, растворяли в 20% ацетонитриле и разделяли на колонке (4,6×250 см) с сорбентом C₁₈ (Applied Biosystems, США). Детекцию Pth-производных аминокислот осуществляли с использованием проточного абсорбциометра, модель 757 (Crotos, США).

Для определения C-концевой аминокислоты 0,02 мкмоль белка инкубировали с 8—10 мкг карбоксипептидазы А в 0,1 мл 0,2 М N-этилморфолинового буфера, pH 8,5, при 37° С, отбирая аликвоты в различные промежутки времени инкубации [17]. Белок осаждали подкислением инкубационной смеси до pH 3,0 уксусной кислотой, в надосадочной жидкости идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии [11] свободные аминокислоты в виде дансилпроизводных и их содержание определяли на аминокислотном анализаторе.

Содержание свободных сульфгидрильных групп в белке определяли спектрофотометрическим методом Элмана с 5,5'-дитио-бис (2-нитробензойной кислотой) [18].

Для определения аминокислотного состава белок гидролизовали 24 ч 5,7 н. HCl при 110° С в вакууме [19]. Анализ аминокислот проводили на анализаторе Durrum-500 (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bode W., Huber R. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. № 2. P. 433—451.
2. Laskowski M., Jr., Kato I. // Ann. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 593—626.
3. Siffert O., Emöd I., Keil B. // FEBS Lett. 1976. V. 66. № 1. P. 114—119.
4. Robinson G. W. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 16. P. 3695—3700.
5. Bidlingmeyer D. V. U., Leary T. R., Laskowski M., Jr. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 17. P. 3303—3310.
6. Quast U., Steffen E. // Z. physiol. Chem. 1975. B. 356. № 5. S. 617—624.
7. Schack P. // C. r. Trav. Lab. Carlsberg. 1967. V. 36. № 4. P. 67—83.
8. Dubois T., Jacquet A., Schnek A. G., Looze Y. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. V. 369. № 3. P. 733—740.
9. Dubois T., Kleinschmidt T., Schnek A. G., Looze Y., Braunitzer G. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. V. 369. № 3. P. 741—754.
10. Baines B. S., Brocklehurst K. // Biochem. J. 1982. V. 205. № 2. P. 205—211.
11. Мосолов В. В., Валуева Т. А., Малова Е. Л., Колосова Г. В., Чебан А. Н. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 4. С. 561—568.
12. Валуева Т. А., Валуев Л. И., Ванчугова Л. В., Мосолов В. В., Платэ Н. А. // Прикл. биохимия и микробиол. 1982. Т. 17. № 3. С. 346—351.
13. Arnon R., Shapira E. // Biochemistry. 1967. V. 242. № 12. P. 3942—3950.
14. Swank R. T., Mankres K. D. // Anal. Biochem. 1971. V. 39. № 2. P. 462—477.
15. Yu-Yu Xu Q., Shively J. E. // Anal. Biochem. 1988. V. 170. № 1. P. 19—30.
16. Левина Н. Б., Слепак В. З., Киселев О. Г., Шемякин В. В., Хохлачев А. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24—31.
17. Ambler R. P. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 436.
18. Ellman G. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 244. № 16. P. 4406—4412.
19. Moore S., Stein W. H. // Meth. Enzymol. 1963. V. 6. P. 819.

Поступила в редакцию
8.VII.1993

T. A. Valueva, L. I. Grigoryeva, Le Thi Fu,
N. A. Potapenko**,
T. Ye. Kovalevich*, Vo Chong Nyan*, V. V. Mosolov*

INTERACTION OF A SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR (KUNITZ) WITH CYSTEINE PROTEINASES

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow;*

**Institute for Experimental Biology, HoChiMinh City;*

***M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The interaction of cysteine proteinases from the latex of papaya fruits (*Carica papaya* L.) with a soybean trypsin inhibitor (Kunitz) immobilized on polyacrylamide gel has been studied. Only one of the latex enzymes formed a stable complex with the immobilized inhibitor in solutions with a low ionic strength. This complex dissociates under mild conditions releasing the active proteinase. Analysis of physico-chemical properties, content of free SH-groups, N- and C-terminal amino acid sequences allowed us to identify the enzyme interacting with the immobilized soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as the papaya protease Ω .