



УДК 577.152.344.042

© 1994 Я. Е. Дунаевский, Е. Б. Павлюкова,
М. А. Белозерский

СВОЙСТВА ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА И СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ МИКРОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЕМЯН ГРЕЧИХИ

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва

Ключевые слова: гречиха, ингибитор, микромицеты, протеиназа, семена, трипсин.

Изучены свойства ингибиторов трипсина из семян гречихи, способных подавлять активность секретируемых протеиназ микромицетов, *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum*. По данным гель-фильтрации на сефадексе G-50 молекулярные массы этих ингибиторов лежат в пределах 8,7—9,2 кДа, а по данным масс-спектрометрии — в пределах 7,7—7,9 кДа. Анализ аминокислотных составов исследованных ингибиторов выявил высокое содержание глутаминовой кислоты и валина и низкое изолейцина, ароматических и серосодержащих аминокислот. Представлены данные о высокой температурной и рН-стабильности изученных ингибиторов. Каждый из выделенных ингибиторов образовывал с трипсином фермент-ингибиторный комплекс в молярном отношении 1:1. На основании данных о модификации исследуемых ингибиторов трипсина из семян гречихи различными агентами предполагается присутствие в их активных центрах остатка аргинина.

Белковые ингибиторы сериновых протеиназ широко представлены во многих видах и тканях высших растений. Особенно их много в клубнях и семенах, где их содержание достигает иногда более 10% от количества запасного белка [1]. Большая часть этих ингибиторов не действует на эндогенные ферменты, а подавляет сериновые протеиназы животного происхождения. Дополнительно некоторые из них ингибируют сериновые протеиназы микроорганизмов [2—4]. На основании этих данных в ряде работ высказывается предположение об участии ингибиторов сериновых протеиназ в защите растения-хозяина от атаки патогенной микрофлоры [5, 6]. Однако, каким образом осуществляется эта защита, до сих пор остается неясным. С целью выяснения роли ингибиторов сериновых протеиназ в создании защитного барьера от разрушающего действия фитопатогенов нами проводятся работы по выделению и изучению свойств этих ингибиторов, выделенных из сухих семян гречихи. В настоящей статье дается характеристика анионных ингибиторов трипсина (ИТ), очищенных с помощью аффинной и высокоэффективной жидкостной хроматографии и способных подавлять активность протеиназ микромицетов, *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum* [7].

Анионообменная хроматография на Моно Q выявила наличие в семенах гречихи множественных форм ИТ. Три из них (ИТ1, ИТ2 и ИТ4), полученные в гомогенном виде [7], были нами охарактеризованы.

Молекулярные массы ИТ из фракций 1, 2 и 4, определенные гель-фильтрацией на сефадексе G-50, составляли соответственно 9,0, 9,2 и 8,7 кДа, а полученные

Аминокислотный состав ингибиторов трипсина из семян гречихи

Аминокислоты	Число остатков												
	ИТ1	ИТ2	ИТ4	ИТ [10]			ИТ [11]						
				I	II	III	I	IIa	IIIa	IIb	Ic	IIIb1	IIIb2
Asp	7	8	8	8	7	7	8	5	5	5	9	12	12
Thr	1	1	1	3	2	3	1	1	1	2	2	2	2
Ser	3	3	4	6	5	10	2	2	2	2	5	7	6
Glu	12	13	13	9	12	8	10	8	8	8	15	19	19
Pro	4	3	4	4	1	6	4	3	4	3	6	6	6
Gly	5	6	6	9	7	6	5	4	4	4	7	9	9
Ala	4	3	4	4	5	3	4	3	3	3	0	0	0
1/2Cys	2	2	2	12	10	10	2	2	2	2	8	8	8
Val	11	10	11	1	3	1	9	7	7	8	2	2	2
Met	1	1	0	1	2	1	1	1	1	0	2	2	2
Ile	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2
Leu	4	4	3	5	4	5	4	2	3	2	5	6	6
Tyr	0	0	0	1	2	1	0	0	0	1	2	2	2
Phe	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2
Lys	3	3	3	6	6	4	4	3	2	3	3	5	5
His	0	1	0	1	2	1	0	0	0	0	2	2	2
Arg	7	7	6	7	8	6	7	5	6	5	12	12	12
Trp	1	1	1	0	0	0	2	2	2	1—2	1	1	1
Сумма	68	69	69	81	79	75	67	51	53	54—55	85	99	98
М, кДа	7,6	7,8	7,6	8	8	8	7,6	6	6	6,2	10	11,5	11,4

с помощью масс-спектрометрии были равны 7,7—7,9 кДа. Приведенные величины хорошо вписываются в пределы, определенные для молекулярных масс большинства изученных растительных ингибиторов протеиназ (6—25 кДа) [8].

Аминокислотные составы трех очищенных ИТ (ИТ1, ИТ2, ИТ4) сходны и характеризуются высоким содержанием глутаминовой кислоты и валина и низким изолейцина, ароматических и серосодержащих аминокислот (табл. 1). С помощью 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) не удалось обнаружить в изученных ИТ свободных сульфгидрильных групп. Из этих данных следует, что остатки цистеина, входящие в состав ИТ, либо перекрестно связаны дисульфидными связями, либо образуют смешанные дисульфиды с неким посторонним соединением типа глутатиона, как показано для α_1 -протеиназного ингибитора [9].

Сравнение аминокислотных составов изученных нами ИТ (табл. 1) с аминокислотными составами ИТ из гречихи, выделенных Ikeda и др. [10] и Kiyohara и Iwasaki [11], показало, что ИТ1, ИТ2 и ИТ4 отличаются от ингибиторов (ИТ I, II и III), описанных в работе [10], и от неустойчивых к действию трипсина ингибиторов (ИТ Ic, IIIb1 и IIIb2) из работы [11] значительно меньшим количеством остатков цистеина (2 против 8—12) и отсутствием гистидина; кроме того, от неустойчивых к трипсину ингибиторов они отличаются наличием остатков аланина. Более сходны исследованные нами ИТ с ингибиторами (ИТ I, IIa, IIIa и IIb), устойчивыми к продолжительному действию трипсина [11]. Однако и в этом случае обнаруживаются некоторые различия, касающиеся присутствия у ИТ1, ИТ2 и ИТ4 более высоких количеств остатков валина и глутаминовой кислоты.

Изучение устойчивости выделенных ИТ по отношению к различным внешним воздействиям выявило их высокую рН-стабильность. В течение 4-часовой инкубации при рН от 1 до 11 исследованные ИТ теряли не более 36% своей

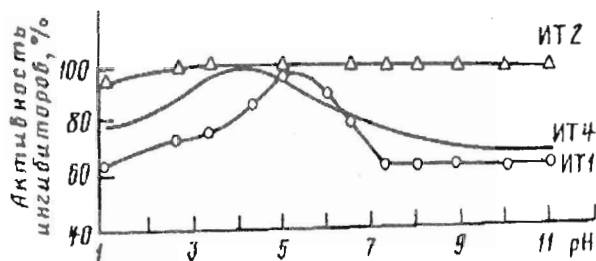


Рис. 1

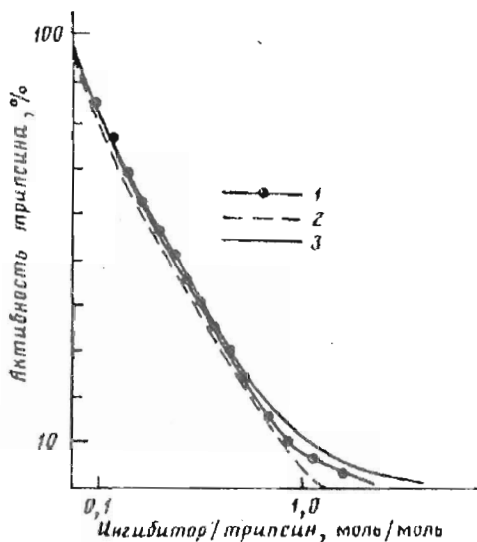


Рис. 2

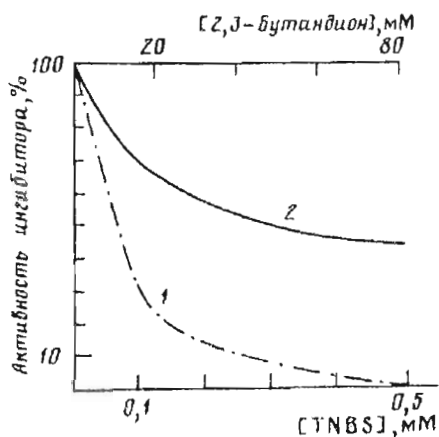


Рис. 3

Рис. 1. pH-Стабильность очищенных препаратов ИТ

Рис. 2. Зависимость активности трипсина от концентрации ИТ1 (1), ИТ2 (2), ИТ4 (3)

Рис. 3. Зависимость активности ИТ от концентрации TNBS (1) и диацетила (2)

активности. Небольшой пик pH-стабильности для ИТ1 находился в интервале 4,5—6,5, а для ИТ4 — в интервале 3—5 (рис. 1). Лишь при pH 13 наблюдалось резкое падение ингибирующей активности у ИТ4 (на 95%) и химотрипсинингибирующей активности у ИТ1 (на 97%), при этом трипсинингибирующая активность у ИТ1 снижалась только на 57%. Наиболее устойчив в этих условиях оказался ИТ2, сохранивший при pH 13 более 90% своей активности.

В табл. 2 приведены данные о стабильности исследуемых ИТ при трех различных pH в условиях их инкубации при 100° С в течение 15 или 30 мин. Полученные результаты свидетельствуют о высокой термостабильности ИТ1 и несколько меньшей ИТ2 и ИТ4 при кислом pH, которые сохраняли более 50% активности после 15 мин при 100° С, тогда как ИТ из сои терял при этой температуре за 9 мин 98% активности, а ИТ из арахиса — 100% [8]. Обнаружено, что при нейтральном, а особенно при щелочном pH термостабильность всех изученных нами ИТ резко падает (в случае ИТ2 до нуля).

Зависимость активности трипсина от возрастающих количеств ИТ1, ИТ2 и ИТ4 представлена на рис. 2. Все три ингибитора вели себя сходным образом, при этом 1 моль каждого из ингибиторов реагировал стехиометрически с 1 моль трипсина, образуя фермент-ингибиторный комплекс в молярном отношении 1 : 1.

Таблица 2

Стабильность очищенных препаратов ИТ при различных рН и температуре 100° С

Ингибиторы	Время, мин	Остаточная активность ИТ, %		
		рН3	рН7	рН9
ИТ1	15	82,9	77,2	57,1
	30	74,6	58,2	42,7
ИТ2	15	54,0	54,0	0
	30	29,0	18,0	0
ИТ4	15	63,8	39,1	27,6
	30	45,6	13,0	8,0

Таблица 3

Модификация остатков аргинина и лизина в молекулах ИТ

Модифицирующий агент	Остаточная активность ИТ, %		
	ИТ1	ИТ2	ИТ4
TNBS	0	0	0
Уксусный ангидрид	100	100	100
2,3-Бутандион (диацетил)	42	43	45

Модификация свободных ε-аминогрупп остатков лизина у изученных нами ИТ с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты (TNBS) в концентрации 0,5 мМ приводила к практически полной инаktivации их трипсинингибирующей активности (табл. 3). Вместе с тем модификация этих же остатков уксусным ангидридом не вызывала снижения ингибиторной активности. Столь различное действие модифицирующих лизин реагентов, возможно, объясняется тем, что, хотя лизин в активных центрах изученных ИТ отсутствует, 2,4,6-тринитробензолсульфокислота, реагируя с остатками лизина, расположенными вблизи активного центра, перекрывает доступность к его функциональным группам и тем самым препятствует взаимодействию ИТ с ферментом. Модификация остатков аргинина с помощью диацетила во всех трех ИТ происходила сходным образом и вызывала снижение трипсинингибирующей активности ИТ1, ИТ2 и ИТ4 на 58, 57 и 55% соответственно (для ИТ2 — см. рис. 3). Увеличение концентрации диацетила выше использованной (80 мМ) не приводило к возрастанию степени ингибирования исследованных ИТ.

Таким образом, для выделенных из семян гречихи анионных ингибиторов трипсина и протеиназ микромицетов характерны низкое содержание серосодержащих аминокислот, высокая температурная и рН-стабильность и, по-видимому, остаток аргинина в активном центре.

Экспериментальная часть

В работе были использованы покоящиеся семена гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) сорта Шатиловская-5.

Для определения активности ингибиторов раствор, содержащий ингибитор, объемом 1—10 мкл смешивали с 5 мкл трипсина (1 мг/мл) и смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После инкубации остаточную активность трипсина определяли по методу Эрлангера [12], используя в качестве субстрата $2 \cdot 10^{-4}$ М раствор *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*D,L*-аргинина в 0,5 М К, Na-фосфатном буфере, рН 7,5.

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Лоури [13] и спектрофотометрически при 280 нм.

Выделение ингибиторов трипсина из экстракта семян гречихи проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с трипсин-сефарозой; элюцию связавшихся ингибиторов осуществляли 1 мМ HCl в присутствии 0,5 М NaCl. После концентрирования и диализа ингибиторы фракционировали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке с Mono Q, элюируя сорбировавшиеся белки линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,1 М, 1 мл/мин, 25 мин). Три ингибитора трипсина (ИТ1, ИТ2 и ИТ4), полученные, как установлено электрофорезом в ПААГ [7], в гомогенном состоянии, были использованы для изучения их свойств.

Молекулярную массу ингибиторов определяли гель-фильтрацией на колонке (1,6×80 см) с сефадексом G-50, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,8; в качестве белков-маркеров были использованы (М, кДа): ингибитор трипсина из сои (22), РНКазы (14), цитохром с (12,4) и убиквитин (8).

Масс-спектрометрический анализ белков проводили с помощью плазменно-десорбционного масс-спектрометра с калифорнийским источником (Cf252) производства НПО «Селми» (г. Сумы, Украина).

Аминокислотный состав ингибиторов определяли стандартным методом на анализаторе Hitachi. Для определения серосодержащих аминокислот белок окисляли смесью 30% H₂O₂ и 88% муравьиной кислоты (1 : 9) и затем гидролизовали 5,7 н. HCl. Триптофан определяли после гидролиза белков 4 н. метансульфоново́й кислотой в присутствии 0,2% триптамина.

Модификацию остатков лизина в молекулах ИТ проводили по методу Хейнеса [14] с использованием в качестве модифицирующего агента 2,4,6-тринитробензолсульфонокислоты и по методу Фридмана [15] при использовании уксусного ангидрида. Модификацию остатков аргинина осуществляли по методу Смита [16], используя вместо 1,2-циклогександиона 2,3-бутандион (диацетил) в концентрации 80 мМ.

Работа поддержана Фондом фундаментальных исследований РАН (П-422).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richardson M. // *Phytochemistry*. 1977. V. 16. № 1. P. 159—169.
2. Mikola J., Suolinna E. M. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1971. V. 144. № 3. P. 566—575.
3. Мосолов В. В., Соколова Е. В., Ливенская О. А. // *Биохимия*. 1984. Т. 49. № 8. С. 1334—1342.
4. Mosolov V. V., Shulgin M. N. // *Planta*. 1986. V. 167. P. 595—600.
5. Ryan C. A. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1973. V. 24. P. 173—196.
6. Ryan C. A. // *Plant Physiol.* 1974. V. 54. P. 328—332.
7. Дунаевский Я. Е., Павлюкова Е. Б., Белякова Г. А., Белозерский М. А. // *Биохимия*. 1994.
8. Belitz H. D., Weder J. K. P. // *Food Rev. Internat.* 1990. V. 6. № 2. P. 151—211.
9. Glazer C. B., Karic L., Huffaker T., Chang R., Martin J. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1982. V. 20. P. 56—62.
10. Ikeda K., Kusano T. // *Agric. Biol. Chem.* 1983. V. 47. P. 481—486.
11. Kiyohara T., Iwasaki T. // *Agric. Biol. Chem.* 1985. V. 49. № 3. P. 589—594.
12. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1961. V. 95. P. 271—278.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265—275.
14. Haynes R., Osuga D. T., Feeney R. E. // *Biochemistry*. 1967. V. 6. № 2. P. 541—547.
15. Freedman M. H., Grossberg A. L., Pressman D. // *Biochemistry*. 1968. V. 7. № 5. P. 1941—1950.
16. Smith G. L. // *Meth. Enzymol.* 1977. V. XLVII. P. 156—161.

Поступила в редакцию
6.VII.1993

Y. E. Dunaevsky, E. B. Pavliukova, M. A. Belozersky

PROPERTIES OF BUCKWHEAT SEED INHIBITORS OF TRYPSIN
AND SERINE PROTEASES FROM MICROMYCETES

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Moscow

Properties of trypsin inhibitors from buckwheat seeds capable to suppress activity of proteases secreted by micromycetes *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* have been studied. The molecular masses of these inhibitors were found to be 8.7—9.2 kDa (gel-filtration) and 7.7—7.9 kDa (mass spectrometry). Amino acid analysis revealed a high content of glutamic acid and valine and a low content of isoleucine, aromatic and sulphur-containing amino acids. Data illustrating temperature and pH stability of the inhibitors are presented. Each of the inhibitors forms an enzyme-inhibitor complex with trypsin in a molar ratio 1 : 1. The inhibitors supposedly contain an arginine residue at the active centre according to the data on their chemical modification.