



УДК 577.112 : 577.152.34

© 1994 Т. С. Калелина, М. В. Нурминская,
Сипин Чжан, О. Ю. Чертов*, Г. Н. Руденская,
В. М. Степанов, И. С. Кулаев

ПРОТЕИНАЗЫ С РАЗЛИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ В СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический и химический факультеты;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: клеточная стенка, дрожжи, структурные белки, коллагеноподобные белки, протеолиз.

Протеолизом с использованием субтилизинов, трипсина и клостридиопептидазы в клеточной стенке дрожжей *Candida utilis* обнаружены две группы белков. Первая группа характеризуется устойчивостью к действию трипсина и гидролизуется субтилизином. В молодых клетках дрожжей эта группа представлена практически одним белком с M 33 кДа, являющимся, по-видимому, основным структурным белком клеточной стенки. Остальные белки относятся ко второй группе, они гидролизуются как субтилизинами, так и трипсином. Эти белки не играют существенной структурной роли. Среди них выделяется белок с M 80 кДа, который гидролизуется клостридиопептидазой, обладающей высокой специфичностью. Сделано предположение, что данный белок содержит последовательность аминокислот, характерную для коллагена высших эукариот.

Основными структурными компонентами клеточной стенки дрожжей являются полисахариды (глюкан, маннан, хитин) и белки (в основном маннопротеины) [1—3]. В настоящее время в составе клеточной стенки дрожжей насчитывают более 30 белков различной степени гликозилирования [4—6], которые заполняют пространство между углеводными фибриллами, а также формируют отдельный слой, располагающийся ближе к наружной поверхности этой органеллы [1, 7]. У некоторых из этих белков обнаружена ферментативная активность [2, 3, 8, 9]. Наиболее изученные ферменты клеточной стенки дрожжей — инвертаза, фосфатаза и некоторые глюконазы. Функции остальных белков изучены весьма слабо. Как правило, их формально объединяют в группу так называемых структурных белков.

Ранее нами было показано, что один из таких белков с M 33 кДа, богато

Сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, КС — клеточные стенки, PZ — 4-фенилазобензиль-оксикарбонил, Np — 4-нитрофенил, pNA — *l*-нитроанилид. Все аминокислоты, кроме указанных, *L* — ряда.

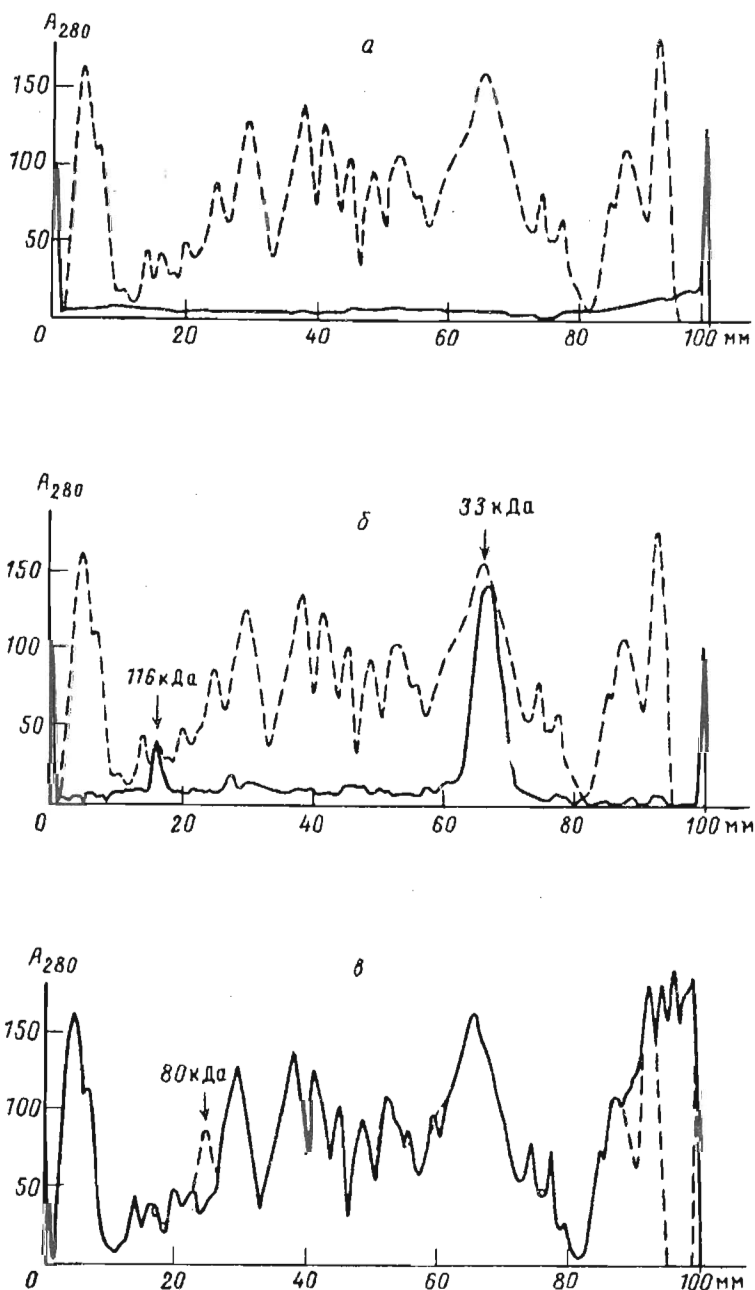


Рис. 1. Электрофорез (денситограмма) в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях белков, экстрагированных из клеточных стенок дрожжей *S. utilis* после обработки последних субтилизином TV (а) (действие субтилизина 72 аналогично, денситограмма не приводится), трипсином (б) и клостридиопептидазой (в). Стрелками отмечены пики, соответствующие белкам с M 33, 80 и 116 кДа. Штриховые линии воспроизводят профиль контрольного образца (без обработки ферментами)

представленный в составе клеточной стенки дрожжей *Candida utilis*, действительно может выполнять весьма важную структурную функцию [7]. Полученные результаты позволяли предположить, что этот белок скрепляет отдельные молекулы полисахаридов или крупные полисахаридные блоки в единую структуру клеточной стенки. Настоящая работа была выполнена для проверки данного предположения,

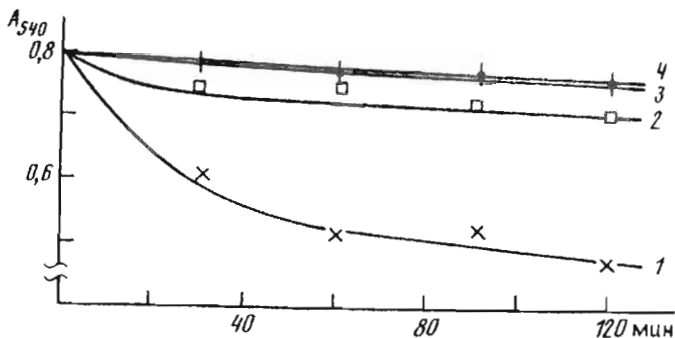


Рис. 2. Изменение оптического поглощения суспензии клеточных стенок дрожжей *C. utilis* при инкубации их с субтилизином TV (1) (аналогичные результаты получены при использовании субтилизина 72), трипсином (2) и клостридиопептидазой (3). 4 — контрольный образец. Количество добавляемых ферментов было уравнено по активности относительно их специфических пептидных субстратов

а также с целью дальнейшего изучения структурной роли белков клеточной стенки дрожжей *C. utilis* методом ограниченного протеолиза с использованием трипсина, субтилизинов и клостридиопептидазы.

Изолированная клеточная стенка дрожжей *C. utilis* содержит белки с M от 20 до 250 кДа и более (рис. 1а, штриховая линия). Субтилизин *Thermoactinomyces vulgaris* (TV) и субтилизин 72 обладают способностью деструктурировать изолированные клеточные стенки дрожжей, что приводит к значительному снижению оптического поглощения суспензии клеточных стенок при инкубации с этими протеиназами (рис. 2). При этом субтилизины полностью удаляют из состава клеточной стенки белковые компоненты (рис. 1а, сплошная линия, табл. 1). При действии на целые клетки эти ферменты если и не лизируют их полностью, то по крайней мере сильно изменяют проницаемость клеточной стенки исследуемых дрожжей, вызывают усиленный переход инвертазы из периплазматического пространства во внешнюю среду (табл. 2).

Действие трипсина сопровождается не столь значительными структурными изменениями в клеточной стенке дрожжей. Эта протеиназа не вызывает уменьшения оптического поглощения суспензии клеточных стенок (рис. 2) и практически не приводит к усилению выхода инвертазы из клеток (табл. 2). В то же время электрофоретический анализ белков, остающихся в составе клеточной стенки дрожжей после действия на нее трипсина (рис. 1б, сплошная линия), демонстрирует, что эта протеиназа оставляет нетронутыми всего два белка (а у молодых клеток единственный белок с M 33 кДа), в то время как все остальные белки трипсин гидролизует полностью. Остающиеся в клеточной стенке трипсинустойчивые белки названы нами «основными структурными белками» клеточной стенки дрожжей *C. utilis*.

Основной трипсинустойчивый белок с M 33 кДа на протяжении 15 аминокислотных остатков в N-концевой области проявляет значительное (60%) сходство с глюканазой из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 3), которая в свою очередь иммунологически родственна белкам, обнаруживаемым в клеточных стенках *Hansenula wingei*, *Torulopsis glabrata*, *Pichia guilliermondii* и др. [3]. Этот факт позволяет предположить, что аналогичные структурные белки могут присутствовать и в клеточных стенках дрожжей других видов.

Анализ общего содержания углеводов и белков в клеточных стенках до и после обработки протеиназами продемонстрировал весьма существенные различия в количестве углеводов, закрепленных в клеточной стенке с помощью трипсинустойчивых (структурных) и гидролизуемых трипсином белков. Из табл. 1 видно, что полное удаление белков (обработка субтилизином) сопровождается переходом в раствор только 38% углеводов (условно эту часть углеводов можно обозначить

Таблица 1

Содержание белков и углеводов в клеточной стенке дрожжей *S. utilis* после гидролиза сериновыми протеиназами с различной субстратной специфичностью

Фермент	Углеводы, %		Белки, %	
	в клеточной стенке	в гидролизате	в клеточной стенке	в гидролизате
—	100	—	100	—
Трипсин	73 ± 3	26 ± 2	15 ± 2	85 ± 2
Субтилизин	62 ± 3	38 ± 2	0	100

Таблица 2

Влияние протеиназ на экспорт и накопление в среде инвертазы и белка из клеток дрожжей *S. utilis*

Фермент *	Активность инвертазы в среде инкубации		Белок в среде, мкг/мл
	удельная, Е/мг белка	суммарная, Е	
Трипсин	58,2	1,26	22
Субтилизин 72	83,0	1,55	19
Субтилизин TV	177,0	3,70	21
Клостридиопептидаза	17,0	3,70	218
Контроль	53,1	1,25	23

* Количество добавляемых ферментов было уравнено по активности относительно их специфических пептидных субстратов: Z-Ala-Ala-Leu-pNA (для субтилизинов), Bz-D,L-Arg-pNA (для трипсина) и PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (для коллагеназы).

как ферментэлюируемые углеводы — ФЭУ). Вместе с тем при обработке трипсином в клеточной стенке наряду с трипсинустойчивыми белками, составляющими примерно 15% от общей массы белка, сохраняется около трети углеводов из группы ФЭУ. Это обстоятельство может свидетельствовать о важной структурной роли трипсинустойчивых белков.

Еще одним ферментом, использованным нами для структурного исследования клеточной стенки дрожжей, стала бактериальная коллагеназа *Clostridium histolyticum* — клостридиопептидаза А. Этот фермент проявляет высокую специфичность по отношению к фибриллярному коллагену в спиральной его части (при полном отсутствии активности по отношению к глобулярным белкам) [10] и гидролизует в нем пептидную связь Y-Gly во фрагментах Y-Gly-Pro-X, где X — аланин или гидроксипролин, а Y — гидроксипролин, аланин или пролин [11—13].

В отличие от субтилизинов и трипсина клостридиопептидаза А гидролизует всего один белок из множества белков клеточной стенки дрожжей (рис. 1в, сплошная линия). Особенно отчетливо действие клостридиопептидазы проявляется в случае использования делипидизированных клеточных стенок (рис. 4). Молекулярная масса гидролизующегося белка, по данным электрофореза, составляет 80 кДа. Вместе с тем действие клостридиопептидазы на целые клетки дрожжей также влияет на изменение в интенсивности выхода инвертазы из клеток (табл. 2), но не приводит к лизису изолированных клеточных стенок дрожжей (рис. 2). По всей вероятности, гидролизующийся белок не несет существенной структурной нагрузки.

Интересно, что на обработку клостридиопептидазой А реагирует увеличением

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
(1)	Val	Gly	Asp	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu	Gly	Val	Gln	Asn	Ser	Ala	Gly
(2)	Ile		Glu								Lys		Asn	Asp	

Рис. 3. N-Концевые последовательности основного структурного белка из клеточной стенки дрожжей *S. utilis* (1) и глюканазы из клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* (2) [3]. Для последовательности 2 приведены только различающиеся аминокислоты

активности протеиназы, присутствующая в клеточной стенке *S. utilis* (табл. 3) (наличие в среде инкубации ингибитора сериновых протеиназ фенолметилсульфонилфторида не оказывало влияния на активируемую протеолитическую активность). Активация протеолитического фермента в присутствии клостридиопептидазы может иметь два различных объяснения: 1) активация в результате гидролиза коллагеноподобной последовательности в самом ферменте (аналогичная ситуация продемонстрирована исследователями на примере фермента пуллуланызы *Klebsiela pneumoniae* FG9 [14]); 2) активация фермента в связи с расщеплением других белков клеточной стенки, происходящим под воздействием клостридиопептидазы.

Независимо от механизма активации протеиназы полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что в клеточной стенке дрожжей может присутствовать белок, содержащий в своем составе коллагеноподобную последовательность, — факт, заслуживающий внимания, поскольку до настоящего момента в литературе отсутствовали данные о существовании коллагеноподобных фрагментов в белках клеточных стенок дрожжей.

Суммируя представленные результаты, следует подчеркнуть, что использованные в работе протеолитические ферменты явились удачным инструментом в структурных исследованиях клеточной стенки дрожжей.

Ранее локализацию и функции белков клеточной стенки дрожжей исследовали, применяя последовательную экстракцию их из состава клеточной стенки такими реагентами, как 2-меркаптоэтанол или EDTA, или анализируя индивидуальные маннопротеины, освобождающиеся в результате растворения клеточной стенки дрожжей препаратами литических глюканаз, такими, например, как зимолиаза [1,4 — 6,8,9]. Неспецифичность действия всех этих агентов являлась существенным препятствием на пути исследования локализации и роли отдельных белков. Многочисленные связи белков клеточной стенки с небелковыми ее компонентами (β 1,3- и β 1,6-глюканами, хитином, маннаном) также очень осложняли исследование. До настоящего времени не выяснена роль белков в структурной организации клеточной стенки, в процессах секреции и транспорта соединений. Предложенный нами подход к структурным исследованиям клеточной стенки дрожжей позволяет вплотную приблизиться к решению этих проблем.

Экспериментальная часть

Культура дрожжей *S. utilis* ВКМУ-74 была любезно предоставлена В. К. Голубевым (ИБФМ РАН, Пушкино). Дрожжи выращивали на жидкой питательной среде при 24° С в условиях аэрации на качалке (200 об/мин) в колбах объемом 700 мл при объеме среды культивирования 200 мл [15]. Состав питательной среды (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,7; NaCl — 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 0,6; KH_2PO_4 — 1,0; K_2HPO_4 — 0,01; дрожжевой экстракт (Difco) — 5,0; глюкоза — 8,0.

В работе использовали трипсин (КФ 3.4.21.4; Bio-Rad), субтилизины (КФ 3.4.21.14) TV [16] и 72 [17], а также клостридиопептидазу А (КФ 3.4.24.3; Serva), которую подвергали дополнительной очистке препаративным электрофо-

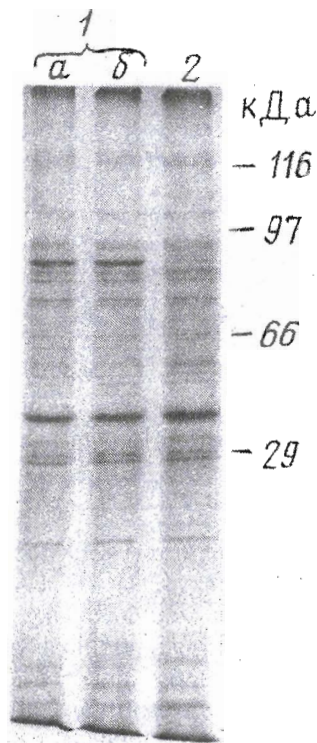


Рис. 4. Электрофорез в полиакриламидном геле белков, экстрагированных из делипидизированных клеточных стенок дрожжей *S. utilis*: 1 — контрольный образец до (а) и после (б) инкубации (2 ч, 30° С); 2 — после инкубации (2 ч, 30° С) изолированных клеточных стенок с клостридиопептидазой

резом для полного удаления следов казеинолитической активности, содержащейся в исходном препарате.

Экстракцию белков клеточной стенки дрожжей проводили трис-НСl-буфером, содержащим 5% меркаптоэтанол и 3% SDS (100° С, 5 мин) [18].

Протеолитическую активность ферментов определяли по расщеплению казеина [19], а также синтетического субстрата сериновых протеиназ — Z-Ala-Ala-Leu-pNA [20].

Активность трипсина и коллагеназы измеряли с использованием в качестве субстратов Vz-D,L-Arg-pNA [21] и PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg [22] соответственно.

Гидролазные активности, ассоциированные с клеточными стенками и клетками дрожжей, определяли с использованием *n*-нитрофенилгликозидов *D*-маннопиранозы и *D*-глюкопиранозы [23], синтетических субстратов аминопептидаз [24] и по нарастанию в среде инкубации восстанавливающих сахаров после гидролиза соответствующего субстрата (1,3-глюкан, хитин, сахароза) [25].

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [26].

N-Концевые последовательности аминокислот определяли после электропереноса белка с полиакриламидного геля на PVDF-мембрану [27, 28] на секвенаторе Applied Biosystems 475A (США).

Ингибирование протеолитической активности ферментов осуществляли с использованием ингибитора сериновых протеиназ фенилметилсульфонилфторида [29].

Получение препарата клеточных стенок. Клетки дрожжей отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (5000 г, 15 мин, 0° С) и дважды отмывали дистиллированной водой. Разрушение клеток проводили в вибромиксере со стеклянными шариками (3 мин, 0° С). Клеточные стенки отделяли от неразрушенных клеток и внутриклеточного содержимого центрифугированием в градиенте сахарозы и многократным промыванием с последовательной сменой рас-

Влияние клостридиопептидазы А на активность ферментов, ассоциированных с изолированными клеточными стенками (А) и поверхностью клеток дрожжей *S. utilis* (Б) *

Фермент	Субстрат	А	Б
Хитиназа	Хитин	—	1,0
Глюканаза	Glcβ1-ONp	1,0	1,0
	Глюкан	1,0	1,0
Маннозидаза	Manα1-ONp	1,0	1,0
Протеиназа	Казеин	6,7	3,2
Аминопептидазы	Ala-pNA	1,0	1,0
	Arg-pNA	1,0	0,85
	Leu-pNA	1,0	1,2

* Приведено отношение активностей, измеренных после и до инкубации с клостридиопептидазой.

творов (1% NaCl, 10% сахараза, вода, 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 7,6). Степень чистоты получаемого препарата клеточных стенок контролировали в фазово-контрастном микроскопе. В работе использованы препараты клеточных стенок, содержащие не более 3% неразрушенных клеток. В основу получения клеточных стенок положен метод, описанный ранее [30]. В некоторых случаях проводились дополнительные процедуры по делипидизации полученного препарата клеточных стенок [3].

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта «Биохимия клеточной поверхности микроорганизмов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frevert J., Ballou C. E. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 753—759.
2. Shepherd M. G. // *Crit. Rev. Microbiol.* 1987. V. 15. P. 7—25.
3. Klebl F., Tanner W. // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. P. 6259—6264.
4. Pastor F. I. J., Valentin E., Herrero E., Sentandreu R. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 802. P. 292—300.
5. Valentin E., Herrero E., Pastor F. I. J., Sentandreu R. // *J. Gen. Microbiol.* 1984. V. 130. P. 1419—1428.
6. Casanova M., Chaffin W. J. // *J. Gen. Microbiol.* 1991. V. 137. P. 1045—1051.
7. Kalebina T. S., Kulaev I. S. // 15th Intern. Symp. on Yeasts, Riga (Abstr). 1991. P. 59.
8. Sentandreu R., Herrero E., Elorza M. V. // *Microbiol Cell Wall Synthesis and Autolysis*/Ed. C. Nobela. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Inc., 1984. P. 51—61.
9. Notario V. // *J. Gen. Microbiol.* 1982. V. 128. P. 747—759.
10. Nordwig A. // *Adv. Enzymol.* 1971. V. 34. P. 155—205.
11. Казакова О. В., Орехович В. Н., Шпукунтер В. О. // Докл. АН СССР. 1958. Т. 122. С. 657—660.
12. Mandl I. // 14th Intern. Congr. Biochem. Abstr. Commun. 1958. P. 18.
13. Michaelis S., Gallop P., Seifder S. // *Biochim. et biophys. acta.* 1958. V. 29. P. 450—454.
14. Charalambous B. M., Keen J. N., McPherson M. J. // *EMBO J.* 1988. V. 7. № 9. P. 2903—2909.
15. Ermacova S. A., Mansurova S. E., Kalebina T. S., Lobakova E. S., Selyach I. O., Kulaev I. S. // *Arch. Microbiol.* 1981. V. 128. P. 394—397.
16. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. P. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1981. V. 100. P. 1680—1687.
17. Акпаров В. Х., Белянова Л. Г., Баратова Л. А., Степанов В. М. // *Биохимия*. 1979. Т. 44. № 5. С. 886—891.
18. Chaffin W. J., Stocco D. M. // *Can. J. Microbiol.* 1983. V. 29. P. 1438—1444.

19. Каверзнева Е. Д.//Прикл. биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. № 2. С. 225—232.
20. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М.//Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 273—279.
21. Erlanger B. F., Kokowsky N., Gohen W.//Arch. Biochem. and Biophys. 1961. V. 95. P. 271—278.
22. Wunsh E., Heidrich H.-G.//Z. Anal. Chem. 1963. B. 333. S. 149—151.
23. Ratto M., Poutanen K.//Biotechnol. Lett. 1988. V. 10. P. 661—665.
24. Frey J., Roehm K.-H.//Eur. J. Biochem. 1979. V. 97. P. 169—174.
25. Jamienson A. D., Pruitt K. M., Caldwell R. C.//J. Dent. Res. 1969. V. 48. P. 483—486.
26. King J., Laemmli U. K.//J. Mol. Biol. 1971. V. 62. № 3. P. 465—477.
27. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
28. Matsudaira P.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 10035—10038.
29. Vemitsu N., Sugiyama H.//Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 258. P. 562—565.
30. Mendoza G. C., Villanueva J. B.//Can. J. Microbiol. 1963. V. 9. P. 141—142.

Поступила в редакцию
20.IX.1993

*T. S. Kalebina, M. V. Nurminskaya, Siping Zhang,
O. Yu. Chertov*, G. N. Rudenskaya, V. M. Stepanov,
I. S. Kulaev*

VARIOUS PROTEINASES IN STRUCTURAL INVESTIGATION OF CELL WALL OF *Candida utilis*

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological and Chemistry Faculty,
Moscow;*

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

Different proteins are revealed in cell wall of yeast cells *Candida utilis* by means of specific proteolysis with subtilisins TV and 72, trypsin and purified collagenase of *Clostridium histolyticum*. Some of them were characterized by resistance to trypsin and sensitivity to subtilisin TV. In young cells this group is represented essentially by a protein of 33 kD, which appears to be one of the structural proteins, binding fibrillae of carbohydrate. Other proteins proved to be sensitive to both trypsin and subtilisin. Among these proteins a protein with mol. mass 80 kD was revealed; its sensitivity to extremely specific hydrolysis by bacterial collagenase suggests it to contain amino acid sequences characteristic for collagens of higher eukaryotes.