



УДК 577.322(53+6):539.26

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ЛЕКТИНА ГОРОХА С D-ГЛЮКОПИРАНОЗОЙ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1.9 Å

© 1997 г. В. З. Плетнев<sup>#</sup>, С. Н. Ружейников, И. Н. Цыганник, И. Ю. Михайлова,  
В. Дюэкс\*, Д. Гош\*, В. Пэнгборн\*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*Медицинский исследовательский центр им. Хауптмана – Вудвард, Буффало, Нью-Йорк, 14203 США

Поступила в редакцию 28.10.96 г. Принята к печати 14.11.96 г.

Методом молекулярного замещения установлена структура нового полученного методом сокристаллизации кристаллического комплекса (пространственная группа  $P2_12_12_1$ , параметры ячейки:  $a$  62.8,  $b$  135.2,  $c$  54.8 Å) лектина гороха (*Pisum sativum*, димер, мол. масса ~52 кДа) с D-глюкопиранозой при разрешении 1.9 Å. Величина стандартного R-фактора после кристаллографического уточнения составляет 18.7%. Показано, что координационные сферы ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , содержащихся в белке, образуются за счет ион-дипольного взаимодействия с четырьмя молекулами воды и шестью аминокислотными остатками лектина. Молекула глюкозы фиксируется шестью водородными связями с остатками Asp81, Gly99, Asn125, Ala217 и Glu218. Небольшой дополнительный вклад в стабилизацию положения моносахарида вносят ван-дер-ваальсовы контакты с боковыми цепями остатков Phe123 и Ala80.

**Ключевые слова:** лектин гороха, кристаллический комплекс, рентгеноструктурный анализ, углеводная специфичность лектина.

Лектины являются представителями широкого класса углеводсвязывающих белков. На важную роль лектинов в процессах жизнедеятельности указывает их наличие на всех уровнях развития организмов, включая вирусы, бактерии, растения, животных и человека. Эти белки обладают свойством агглютинировать клетки и преципитировать гликоконъюгаты, участвуют в таких процессах, как эндо- и фагоцитоз, морфогенез, очистка биологических систем от вредных и чужеродных агентов и т.д. [1]. Кроме того, ряд растительных лектинов, по-видимому, играет важную роль в симбиозе растений с азотфиксирующими бактериями [2, 3]. Биологическая активность лектинов основана на их способности специфично и обратимо (без нарушения ковалентной структуры) связывать углеводы [4, 5].

Среди белков, родственных лектину гороха, наиболее подробно исследованы лектины семян овощных растений – канавалии мечевидной (конканавалин А, Con A), конских бобов (фавин), гороха, чечевицы, *Lathyrus ochrus*. Эта группа  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ -содержащих белков проявляет высокую моносахаридную специфичность к маннозе и глюкозе, обладая в то же время тонкими различиями в олигосахаридной специфичности [6, 7]. Лектины этой группы характеризуются высокой степенью

гомологии аминокислотной последовательности [8] и значительной консервативностью пространственной организации молекул.

Особый интерес представляет выяснение структурных основ тонких различий в углевод-белковых взаимодействиях, осуществляемых столь сходными биополимерами. Эффективность такого рода исследований значительно повышается при наличии детальной информации о пространственной организации активных центров этих белков и особенно их комплексов с различными сахарами.

К настоящему времени методами белковой кристаллографии установлены пространственные структуры ряда гомологичных растительных лектинов (Con A, фавина, изолектинов *L. ochrus*, лектина гороха) как в свободной форме, так и в комплексе с различными углеводами [9–11]. В частности, для объекта наших исследований – лектина гороха – установлена трехмерная структура его свободной формы [12], а также комплексов с триманнозидом [13] и с иодпроизводным глюкозы [14]. Структура последнего комплекса, полученного вымачиванием кристаллов свободного лектина гороха в растворе бензил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-3-иод-D-глюкопиранозиды была установлена с разрешением 1.8 Å [14]. При этом молекула сахара была обнаружена только в одном из двух связывающих центров димера белка с

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: 330-75-10, e-mail: pletnev@tek.siobc.ras.ru).

относительно низким коэффициентом заполнения. Кроме того, замена в использованном производном глюкозы кислорода на иод в положении 3 не могла не привести к некоторому искажению структуры стереохимического окружения углевода [14].

Для получения более точного представления о стереохимической организации углеводсвязывающего центра лектина гороха нами была разработана процедура приготовления качественных кристаллических комплексов этого белка с природными углеводами [15]. Данная процедура, основанная на методе сокристаллизации белка и углевода, позволила, как показали дальнейшие рентгеноструктурные исследования, получить качественные кристаллические комплексы с высокими коэффициентами заполнения обоих активных центров.

Использовавшаяся в настоящей работе кристаллическая форма комплекса белка с глюкозой относится к пространственной группе  $P2_12_12_1$  с параметрами ячейки  $a$  62.8,  $b$  135.2 и  $c$  54.8 Å; на элементарную ячейку приходится четыре димерных молекулы белка с молекулярной массой около 52 кДа. Каждый мономер состоит из двух полипептидных цепей, тяжелой  $\beta$  (остатки 1–181) и легкой  $\alpha$  (остатки 188–239), образовавшихся путем вырезания фрагмента 182–187 в результате посттрансляционной модификации лектина [12].

Заметное изменение параметров ячейки полученного кристаллического комплекса по сравнению со свободной формой ( $P2_12_12_1$ ;  $a$  61.16,  $b$  136.59,  $c$  50.73 Å [12]) явилось предварительным доказательством факта связывания глюкозы лектином. Полученные результаты, а также планируемые рентгеноструктурные исследования комплексов лектина с другими моносахаридами, такими, как *D*-маннопираноза и метил- $\alpha$ -*D*-маннопиранозид, дадут дополнительный вклад в имеющуюся структурную базу, необходимую для изучения тонких аспектов белок-углеводного узнавания и специфичности связывания для данного семейства белков.

Как и следовало ожидать, основные структурные черты исследуемого углеводного комплекса и взаимная ориентация мономеров очень близки к таковым в структуре свободного димера лектина и ряда его углеводных комплексов [12–14].

Пространственная организация мономера и топология пространственной укладки полипептидной цепи представлены на рис. 1 и 2. Супервторичная структура каждого мономера включает в себя сэндвичевую укладку из двух основных  $\beta$ -слоев. Первый слой, уплощенный, состоит из 6 антипараллельных  $\beta$ -сегментов, второй, заметно изогнутый, – из 7. Наибольший изгиб обнаруживает сегмент 39–52 (рис. 2) в области Ser47. Этот остаток, выпадая из  $\beta$ -структурного состояния,

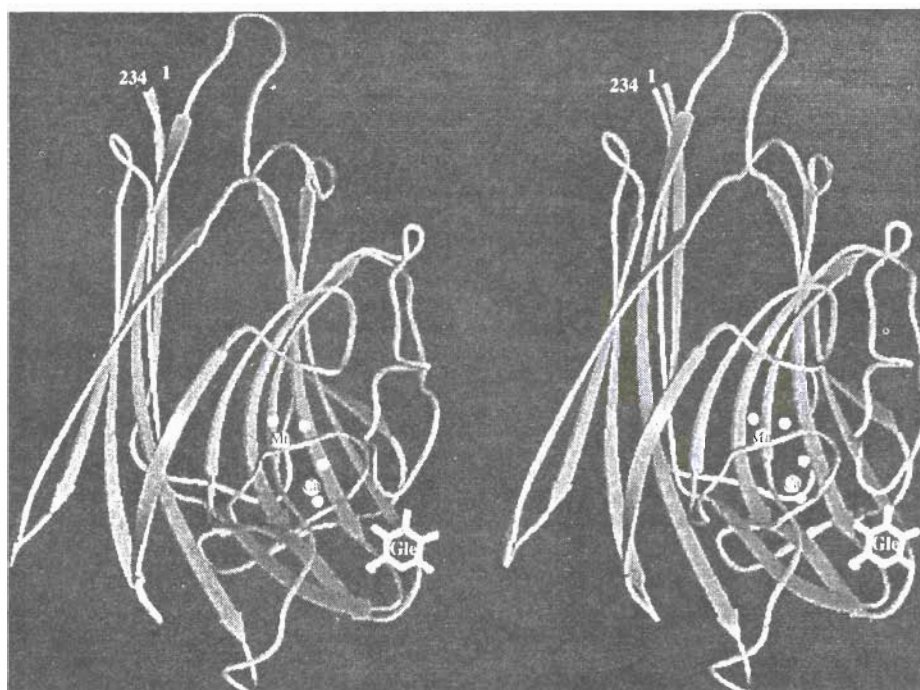


Рис. 1. Стереорепрезентация пространственной структуры мономера лектина. Показаны также молекулы глюкозы и воды (светлые окружности наименьшего диаметра), участвующей в координации ионов металлов, и сами ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ .  $\beta$ -Сегменты изображены в виде лент со стрелками. Наиболее изогнутый 7-сегментный  $\beta$ -слой расположен в центральной части рисунка, 6-сегментный – в левой.



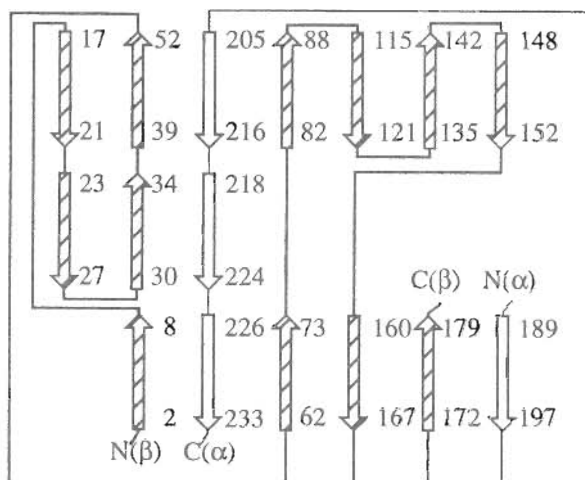


Рис. 2. Топологическая схема структурной укладки мономера лектина.  $\beta$ -Сегменты  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей мономера изображены соответственно светлыми и заштрихованными стрелками с цифровыми обозначениями начальных и конечных остатков. Наиболее изогнутый 7-сегментный  $\beta$ -слой образуют участки полипептидной цепи, представленные в верхней части рисунка; более уплощенный 6-сегментный  $\beta$ -слой – участки цепи, представленные в нижней части. Сегменты 23–27 и 30–34 формируют дополнительную  $\beta$ -шпильку, участвующую вместе с основными  $\beta$ -слоями и коротким  $\beta$ -сегментом 218–224 в формировании гидрофобного ядра мономера.

создает резкий излом данного сегмента, который в принципе может быть представлен в виде двух более коротких  $\beta$ -сегментов. Кроме того, в структуре мономеров присутствует дополнительно 2-сегментная  $\beta$ -шпилька 23–34, которая вместе

с основными  $\beta$ -слоями формирует внутреннее гидрофобное ядро молекулы. Данная  $\beta$ -шпилька, объединяясь с коротким сегментом 218–224, образует третий трехсегментный неразвитый  $\beta$ -слой, расположенный перпендикулярно 6-сегментному уплощенному слою.

В димерной молекуле лектина (рис. 3) мономеры связаны некристаллографической осью 2-го порядка, расположенной перпендикулярно уплощенным  $\beta$ -слоям сэндвичевых структур мономеров. При этом 6-сегментные слои мономеров объединяются в единый уплощенный 12-сегментный слой за счет водородных связей, реализующихся в межмономерной области между первыми  $\beta$ -сегментами (остатки 2–8) тяжелых цепей мономеров (рис. 4, табл. 1). Оба изогнутых 7-сегментных  $\beta$ -слоя, располагаясь над 12-сегментным слоем, завершают образование неидеальной сэндвичевой супервторичной структуры димерной молекулы лектина.

Доступная поверхность димера ( $16088 \text{ \AA}^2$ ), вычисленная методом катящегося шарика с радиусом  $r = 1.6 \text{ \AA}$  [16], меньше суммы соответствующих поверхностей составляющих его мономеров ( $9154$  и  $9225 \text{ \AA}^2$ ) за счет взаимного экранирования части поверхности в межмономерном пространстве. При этом площадь экранированного интерфейса для каждого мономера составила  $1146 \text{ \AA}^2$ . Более 200 молекул воды удерживаются водородными связями на внешней поверхности димерного белка, образуя его сольватную оболочку.

Металл- и углеводсвязывающие центры в каждом мономере лектина пространственно

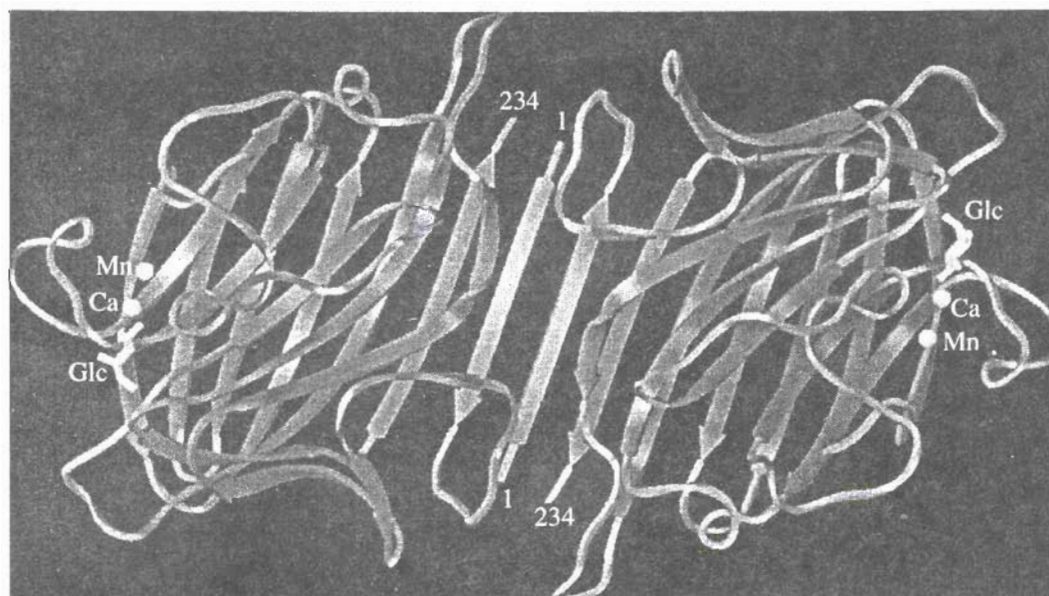


Рис. 3. Пространственная структура димера лектина с обозначением положения глюкозы, ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Некристаллографическая ось симметрии 2-го порядка расположена перпендикулярно плоскости рисунка.

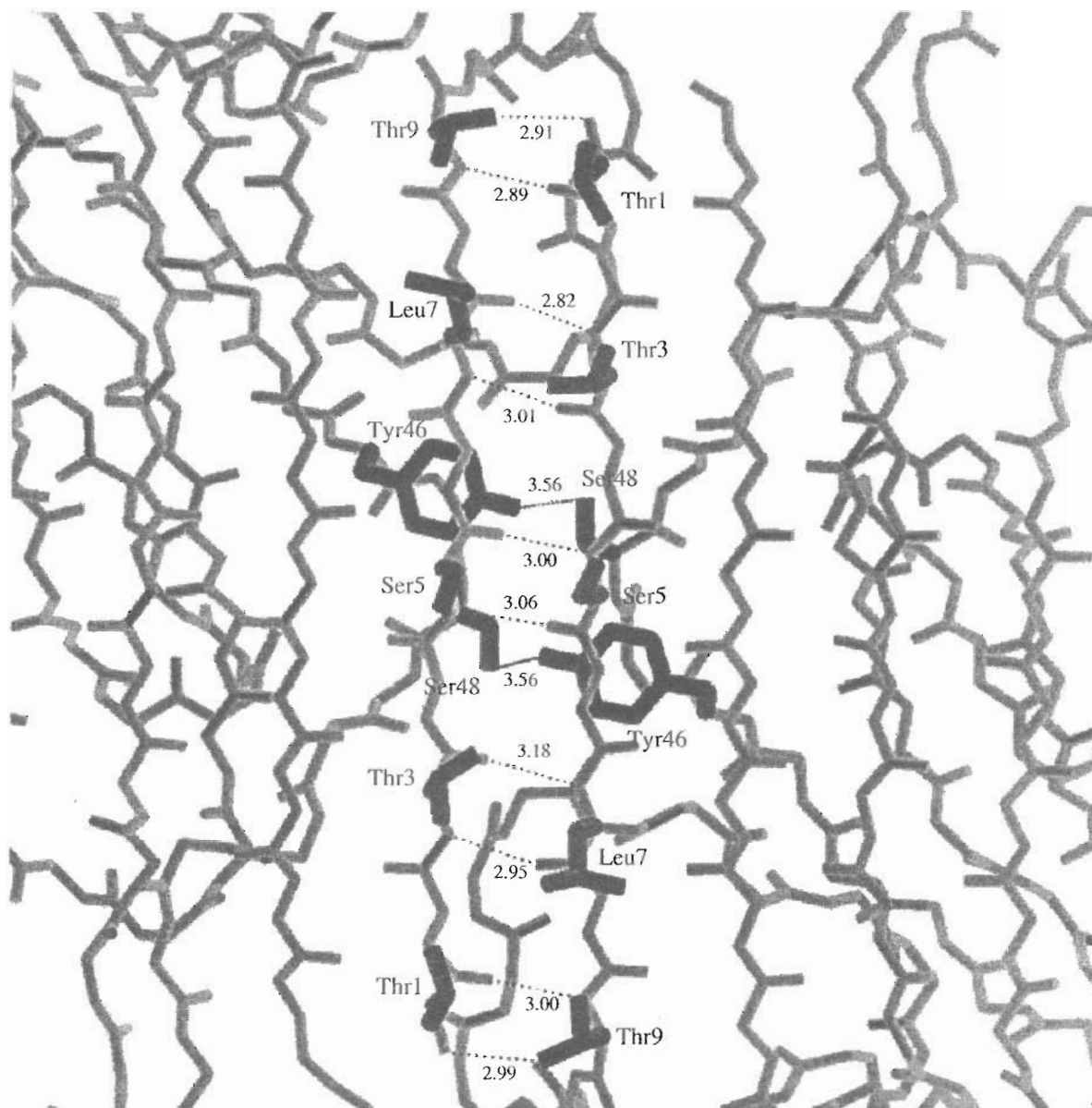


Рис. 4. Область межмономерных контактов лектина. Черным цветом показаны участвующие во взаимодействии аминокислотные остатки; пунктирные линии обозначают водородные связи (длины в Å).

близки и располагаются в удаленных от интерфейса областях димерной структуры (рис. 3, 5). Координационная сфера природных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , располагающихся в глубине узкой полости мономеров лектина, очень консервативна и практически не отличается от соответствующей сферы в Con A [9]. Связывание ионов металлов осуществляется за счет ион-дипольного взаимодействия с аминокислотными остатками Glu119, Asp121, Phe123, Asn125, Asp129, His136 и четырьмя молекулами воды, дополняющими координацию ионов до близкой к октаэдрической (рис. 1, 6, табл. 2). При этом из семи связей иона  $\text{Ca}^{2+}$  (вместо шести при идеальной октаэдрической координации)

две образованы атомами  $\text{O}^{\delta 1}$  и  $\text{O}^{\delta 2}$  боковой цепи одного и того же остатка Asp121. Исключительно важное значение металлов в функционировании лектина, по-видимому, связано с их структурной ролью в пространственной стабилизации нерегулярного петлевого участка 120–130, взаимодействующего с молекулой углевода.

Молекула глюкозы в классической конформации кресла в исследуемом комплексе располагается в небольшой полости на поверхности белка вблизи металлсвязывающего центра и удерживается там шестью водородными связями с функциональными группами белка, представленными остатками Asp81, Gly99, Asn125, Ala217, Glu218



(рис. 7, табл. 3). Основной вклад в образование водородных связей со стороны углевода вносят гидроксильные группы при C3, C4 и C6, а также циклический атом кислорода O5. Из них OH-группы при C4 и C6 являются донорами протонов, остальные – акцепторами протонов. Семь коротких ван-дер-ваальсовых контактов (в пределах 3.6–3.9 Å) групп C5H и C6H<sub>2</sub> углевода с атомами ароматического кольца боковой цепи Phe123 и боковой цепи Ala80 вносят небольшой дополнительный вклад в стабилизацию положения глюкозы. Как и в случае Con A [9], редкое для белков конформационное состояние с *цис*-пептидной связью, предшествующей остатку Asp81 в лектине, обеспечивает ориентацию соответствующей боковой цепи, необходимую для образования двух стабилизирующих водородных связей с углеводом. Несомненно, что наблюдаемая углеводная специфичность лектина в значительной степени определяется данной уникальной трехмерной системой водородных связей.

#### Выделение и кристаллизация белка, сбор дифракционных данных

Семена гороха (*P. sativum*) без предварительного измельчения замачивали в 1% водном растворе NaCl и выдерживали 15–18 ч при 6–8°C. Затем разбухшие семена растирали до кашеобразного состояния и перемешивали при комнатной температуре около 2 ч. После центрифугирования препарата супернатант подкисляли 4 н. HCl до pH 4.0 и образовавшийся осадок удаляли центрифугированием, а надосадочную жидкость, содер-

Таблица 1. Межмономерные водородные связи в димере лектина гороха\*

Мономер 1	Мономер 2	Расстояние, Å
Thr1 (NH)	Thr9 (O <sup>γ</sup> )	2.99
Thr1 (CO)	Thr9 (NH)	3.00
Thr3 (NH)	Leu7 (CO)	2.95
Thr3 (CO)	Leu7 (NH)	3.18
Ser5 (NH)	Ser5 (CO)	3.06
Ser5 (CO)	Ser5 (NH)	3.00
Leu7 (NH)	Thr3 (CO)	3.01
Leu7 (CO)	Thr3 (NH)	2.82
Thr9 (NH)	Thr1 (CO)	2.89
Thr9 (O <sup>γ</sup> )	Thr1 (NH)	2.91
Tyr46 (O <sup>η</sup> H)	Ser48 (O <sup>γ</sup> H)	3.56
Ser48 (O <sup>γ</sup> H)	Tyr46 (O <sup>η</sup> H)	3.56

\* В скобках указана группа, вовлеченная в образование водородной связи; обозначения атомов здесь и далее даны в соответствии с рекомендациями NC IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1970. V. 17. P. 193–201).

жащую лектин, нейтрализовали 10% раствором NaOH до pH 7.0 и высаливали сульфатом аммония (200 г/л). После выдерживания в течение 12–15 ч на холоду раствор центрифугировали; к супернатанту, содержащему лектин, еще раз добавляли сульфат аммония до концентрации 400 г/л. Полученный после второго высаливания осадок растворяли в дистиллированной воде и наносили на

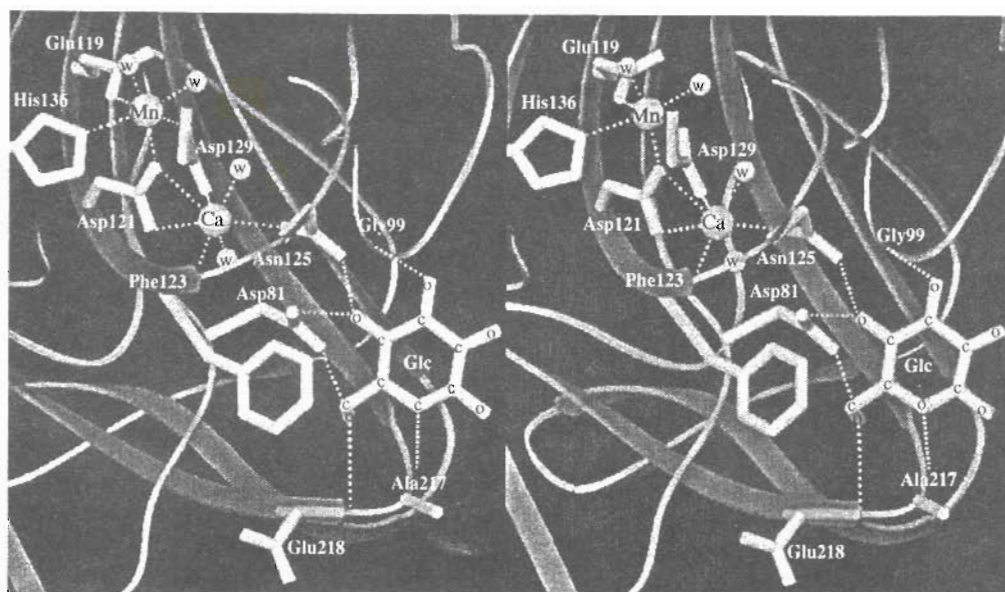


Рис. 5. Стереорепрезентация металл- и углеводсвязывающих центров комплекса лектина с глюкозой и ионами Ca<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>.

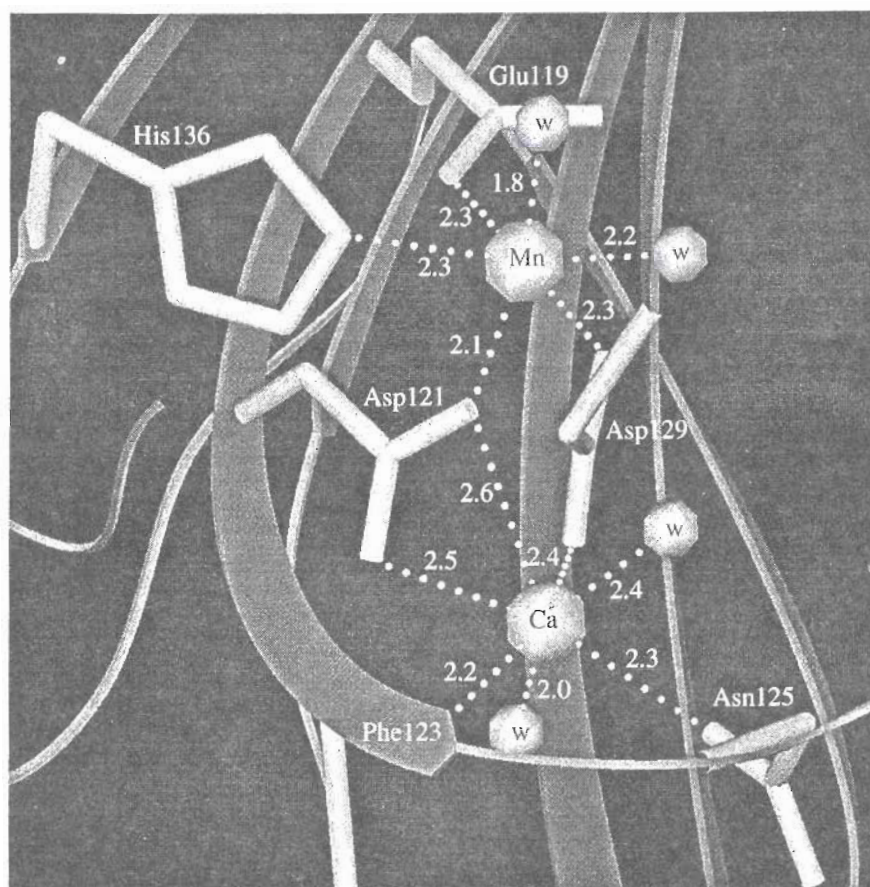


Рис. 6. Стереохимическая структура координационной оболочки связанных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в металлсвязывающем центре комплекса лектина (цифрами показаны средние по двум мономерам величины расстояний в Å).

колонку ( $1.8 \times 8$  см) с сефадексом G-100, уравновешенным раствором 1 M NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  и 1 mM  $\text{MnCl}_2$  в 0.1 M NaOAc, pH 6.7. Соли Ca и Mn добавляли для предотвращения потери лектином ионов этих металлов, необходимых для поддер-

Таблица 2. Геометрия координационных сфер ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в металлсвязывающих центрах мономеров (M1, M2) лектина

Аминокислотный остаток	Расстояние, Å					
	$\text{Ca}^{2+}$			$\text{Mn}^{2+}$		
	M1	M2	Среднее	M1	M2	Среднее
Glu119 ( $\text{O}^{\delta 1}$ )	—	—	—	2.28	2.31	2.30
Asp121 ( $\text{O}^{\delta 1}$ )	2.40	2.49	2.45	—	—	—
Asp121 ( $\text{O}^{\delta 2}$ )	2.66	2.47	2.57	1.98	2.17	2.08
Phe123 (CO)	2.14	2.21	2.18	—	—	—
Asn125 ( $\text{O}^{\delta 1}$ )	2.40	2.21	2.31	—	—	—
Asp129 ( $\text{O}^{\delta 2}$ )	2.47	2.30	2.39	—	—	—
Asp129 ( $\text{O}^{\delta 1}$ )	—	—	—	2.23	2.30	2.27
His136 ( $\text{N}^{\epsilon 2}$ )	—	—	—	2.52	2.14	2.33
$\text{H}_2\text{O}$ (O)	2.24	2.49	2.37	—	—	—
$\text{H}_2\text{O}$ (O)	1.99	2.02	2.01	—	—	—
$\text{H}_2\text{O}$ (O)	—	—	—	1.74	1.93	1.84
$\text{H}_2\text{O}$ (O)	—	—	—	2.10	2.24	2.17

жания белка в биологически активном состоянии. После промывки колонки адсорбированный лектин элюировали 50 mM раствором глюкозы в том же буфере, диализовали против дистиллированной воды и концентрировали на мембранном фильтре. Затем белок подвергался дополнительной очистке методом препаративного изоэлектрического фокусирования в гранулированном геле Ultrodex (Pharmacia) с использованием градиента pH 5–8, где разделялся на две фракции с  $pI$  около 6.9 (использовалась в данной работе) и  $pI$  7.6. Полученные фракции лектина еще раз диализовали против дистиллированной воды и концентрировали на мембранном фильтре до поглощения не менее 19–20  $\text{OE}_{280}$  (около 12 мг/мл).

При кристаллизации к раствору белка в качестве осадителя добавляли 5–8% водный раствор этанола, а также избыток глюкозы до концентрации около 60 mM, что обеспечивало примерно 150-кратное мольное превышение концентрации углевода по сравнению с лектином. После дополнительного центрифугирования раствор помещали в стеклянные ячейки и выдерживали при  $4^\circ\text{C}$  1–2 нед до появления призматических кристаллов углеводного комплекса. Аналогичный результат



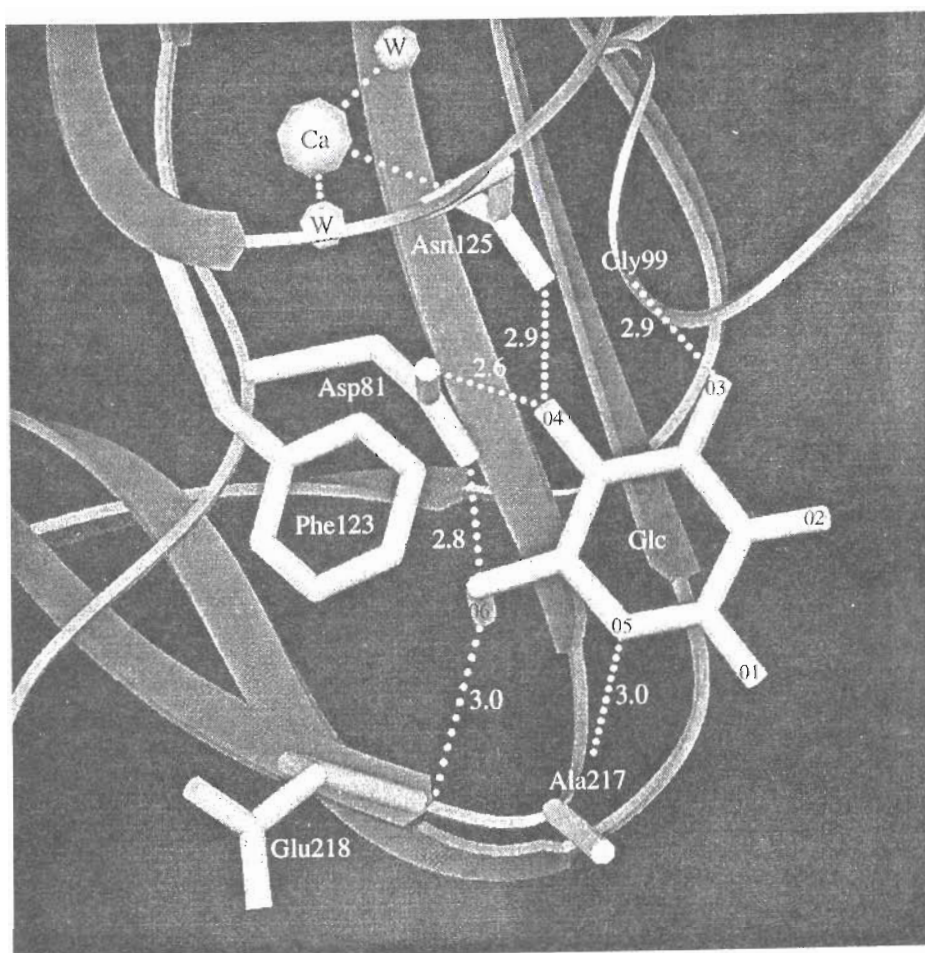


Рис. 7. Стереохимическая структура координационной оболочки связанной глюкозы в углеводсвязывающем центре комплекса лектина (цифрами показаны средние величины расстояний по двум мономерам).

был получен при кристаллизации методом диализа против раствора этанола (6–10%) с углеводом (60 мМ).

Сбор дифракционных данных кристаллического комплекса лектина гороха с глюкозой производился на автодифрактометре Rigaku R-AXIS Пс (Япония) с двумерным детектором при комнатной температуре. Соответствующие кристаллографические и экспериментальные данные приведены в табл. 4.

**Определение структуры комплекса** осуществлялось методом молекулярного замещения, реализованным в программе XPLOR [17], с использованием структуры свободной формы лектина [12] в качестве поисковой модели. Электронная плотность, отвечающая положениям связанной глюкозы в углеводсвязывающих центрах обоих мономеров, отчетливо проявилась на разностном ( $F_o - F_c$ ) синтезе электронной плотности (рис. 8).

Молекулярно-графическую правку модели проводили на графической станции Silicon Graphics Iris Indigo (США) с использованием програм-

мы CHAIN (модифицированная версия FRODO [18]). Данная процедура многократно повторялась попеременно с кристаллографическим уточнением по программе XPLOR [17], включающей в себя молекулярную динамику для моделирования

Таблица 3. Система водородных связей в углеводсвязывающих центрах мономеров M1 и M2 лектина.

Аминокислотный остаток	Атом глюкозы	Расстояние, Å		
		M1	M2	Среднее
Gly99 (NH)	O3	2.86	2.98	2.92
Asn125 (N <sup>δ2</sup> H)	O4	2.96	2.85	2.91
Ala217 (NH)	O5	3.13	2.97	3.05
Glu218 (NH)	O6	3.12	3.11	3.12
Asp81 (O <sup>δ1</sup> )	O4	2.64	2.57	2.61
Asp81 (O <sup>δ2</sup> )	O6	2.86	2.78	2.82

**Таблица 4.** Кристаллографические и экспериментальные данные

Источник	<i>Pisum sativum</i>
Число остатков на мономер (цепи: $\alpha + \beta$ )	233(181 + 52)
Молекулярная масса димера, кДа	52
Размеры кристалла, мм	0.15 × 0.20 × 0.60
Форма кристалла	Призматическая
Пространственная группа	$P2_12_12_1$
Параметры ячейки (Å)	
<i>a</i>	62.84
<i>b</i>	135.25
<i>c</i>	54.78
<i>Z</i>	4
Разрешение, Å	1.9
Общее число измерений	95762
$R_{\text{merge}}$ , %	9.11
Полнота экспериментальных данных, %	71.5
Число независимых рефлексов:	
общее	26905
использовано в уточнении ( $F_o > 2\sigma(F_o)$ )	24700

туннельного перехода путем медленного охлаждения системы с 3000 до 300 К. Эта процедура эффективно увеличивает радиус сходимости итерационного процесса при уточнении структуры. На начальной стадии уточнение проводилось с использованием некристаллографической симметрии димерной структуры лектина. На последующей стадии оба мономера уточнялись независимо. Вследствие разупорядоченности С-концевых фрагментов 235–239 в структуре обоих мономеров определить с необходимой степенью достоверности их положение на карте электронной плотности не удалось. На заключительном этапе было локализовано 237 молекул упорядоченной воды, располагающихся в первом и втором внешних координационных слоях белка. Окончательные результаты уточнения суммированы в табл. 5. Полученные с помощью программы PROCHECK [19] и XPLOR [17] оценки качества геометрии и стереохимии уточненной структуры отражены в табл. 5 и рис. 9, 10. Иллюстрации стилизованных изображений структурных областей углеводного комплекса лектина выполнены с помощью программы SETOR [20].

**Таблица 5.** Статистика уточнения

Число неводородных атомов в модели	
белковый димер (2 × 228 из 2 × 233 остатков)	5176
глюкоза (2 молекулы)	24
Ca <sup>2+</sup>	2
Mn <sup>2+</sup>	2
вода	237
Интервал разрешения, Å	8–1.9
<i>R</i> -фактор ( $F_o > 2\sigma(F_o)$ )	0.187
$R_{\text{free}}$ -фактор (по 10% данных)	0.227
<i>R</i> -фактор ( $F_o > 0$ )	0.199
Средний <i>B</i> -фактор, Å <sup>2</sup>	
вся структура	20.4
основная цепь	18.3
боковые цепи	22.6
Среднеквадратичные отклонения параметров от идеальных значений	
связь, Å	0.01
угол, град	1.73
торсионный угол, град	27.57
планарность, град	1.38
Среднеквадратичное расстояние между атомами мономеров, совмещенных методом наименьших квадратов, Å	0.81
Статистика $\phi$ , $\psi$ -распределения (406 остатков, исключая Gly и Pro) на карте Рамачандрана, %	
в наиболее благоприятных областях	88.4
в дополнительно разрешенных областях	11.6
в запрещенных областях	0.0
Случайная позиционная ошибка по методу Лузатти, Å	0.23



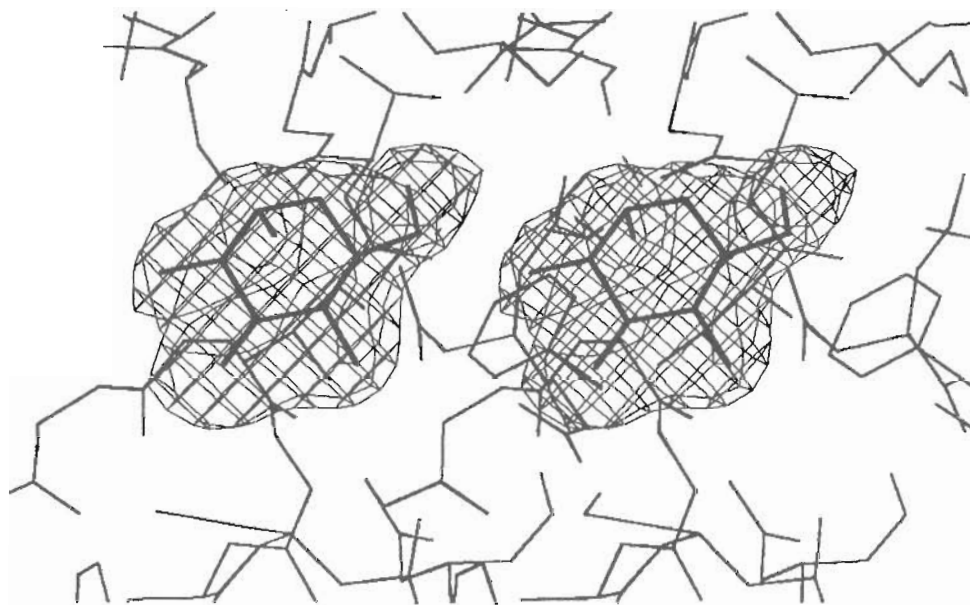


Рис. 8. Стереоразложение разностной (с коэффициентами  $(F_o - F_c)$ ) карты электронной плотности (уровень  $3\sigma_f$ ) области связанной глюкозы одного из мономеров углеводного комплекса лектина (при расчете фазовых углов координаты атомов углевода не учитывались).

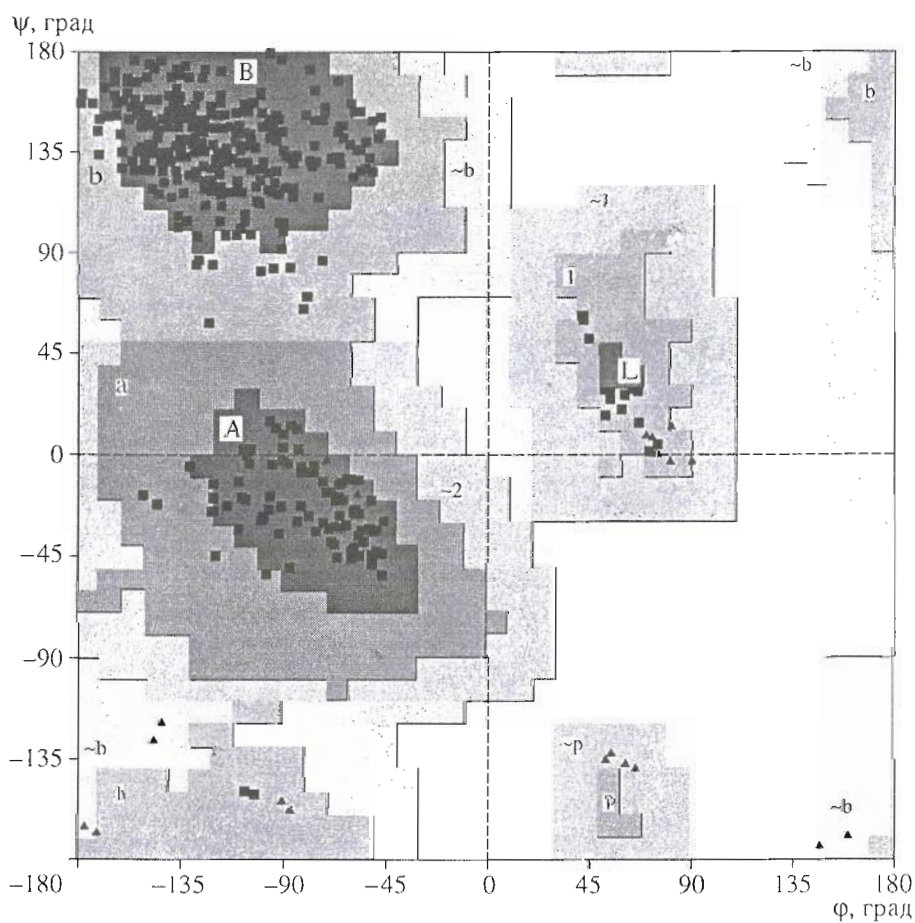


Рис. 9. Конформационная карта Рамачандрана с распределением  $\phi, \psi$ -углов 456 остатков уточненной структуры углеводного комплекса лектина; А, В, L – наиболее предпочтительные области (самый темный фон); а, b, l, p – дополнительно разрешенные области (серый фон); ~а, ~b, ~l, ~p – ограниченно разрешенные области (бледный фон); запрещенные области показаны белым цветом.

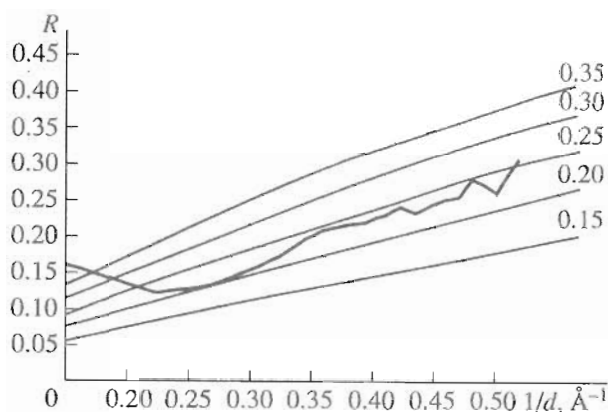


Рис. 10. График Лузатти [21] с распределением  $R$ -фактора от разрешения ( $1/d$ ,  $\text{\AA}^{-1}$ ) и оценкой случайной позиционной ошибки (даны цифры в  $\text{\AA}$  на соответствующих линиях теоретического распределения) для уточненной структуры углеводного комплекса лектина.

Авторы выражают большую благодарность д-ру хим. наук Н.В. Бовину (ИБХ РАН) за обсуждение результатов и ценные замечания.

Представленное в данной публикации исследование было выполнено частично при поддержке грантов № 95-04-11640а РФФИ, № JE4100 МНФ и 03.0002Н-322 ГНТПР "Новейшие методы биоинженерии".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лахтин В.М. // Итоги науки и техники. Серия "Биотехнология". 1987. Т. 2. С. 34–38.
2. Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.M. // Abstracts of 11th International Lectin Conference. 1989. Tartu. P. 16.

3. Bourne Y., Mazurier J., Legrand D., Rouge P., Montreuil J., Spik G., Cambillau C. // Structure. 1994. V. 2. P. 209–219.
4. Mataka O. // Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 1957. V. 35. Suppl. 11. P. 1–156.
5. Gallagher J.T. // Biosci. Repts. 1984. V. 4. P. 621–632.
6. Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G., Montreuil J. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 41–55.
7. Rouge P., Sousa-Cavada B. // Plant Sci. Letters. 1984. V. 37. P. 21–27.
8. Yarwood A., Richardson M., Sousa-Cavada B., Rouge P. // FEBS Letters. 1985. V. 184. P. 104–109.
9. Derewenda Z., Yariv J., Helliwell J.R., Kalb A.J., Dodson E.J., Papiz M.Z., Wan T., Campbell J. // EMBO J. 1989. V. 8. P. 2189–2193.
10. Bourne Y., Roussel A., Frey M., Rouge P., Fontecilla-Camps J.-C., Cambillau C. // Proteins: Structure, Function and Genetics. Wiley-Liss, Inc., 1990. P. 365–376.
11. Bourne Y., Mazurier J., Legrand D., Rouge P., Montreuil J., Spik G., Cambillau C. // Structure. 1994. V. 2. P. 209–219.
12. Einspahr H., Parks E.H., Suguna K., Subramanian E., Suddath F.L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 16518–16527.
13. Rini J.M., Hardman K.D., Einspahr H., Suddath F.L., Carver J.P. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 10126–10132.
14. Лобсанов Ю.Д., Плетнев В.З. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 122–125.
15. Михайлова И.Ю., Цыганник И.Н., Фонарев Ю.Д., Куликов Ю.В., Плетнев В.З. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 479–480.
16. Lee B., Richards F.M. // J. Mol. Biol. 1971. V. 55. P. 379–400.
17. Brunger A.T. X-PLOR (Version 3.1) Manual. Yale University, New Haven and London, 1992.
18. Jones T.A. // J. Appl. Crystallogr. 1978. V. 11. P. 268–272.
19. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // J. Appl. Crystallogr. 1993. V. 26. P. 283–291.
20. Evans S.V. // J. Mol. Graphics. 1993. V. 11. P. 134–138.
21. Luzatti P.V. // Acta Cryst. 1952. V. 5. P. 802–810.

## The Structure of Pea Lectin–*D*-Glucopyranose Complex at a 1.9 Å Resolution

V. Z. Pletnev\*, S. N. Ruzhenikov\*, I. N. Tsygannik\*, I. Yu. Mikhailova\*,  
W. Duax\*\*, D. Ghosh\*\*, and W. Pangborn\*\*

\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

\*\*Hauptman-Woodward Medical Research Institute, Buffalo, NY, 14203 USA

Received October 28, 1996; in final form, November 14, 1996

**Abstract**—The structure of a new crystal complex of pea lectin (*Pisum sativum*, dimer, molecular mass ca. 52 kDa) with *D*-glucopyranose grown by a cocrystallization procedure was determined by the molecular replacement method at a 1.9 Å resolution (space group  $P2_12_12_1$ , unit cell parameters  $a = 62.8$ ,  $b = 135.2$ ,  $c = 54.2$  Å). After crystallographic refinement, the standard  $R$ -factor was equal to 18.7%. Coordination of captured  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ions included in the protein is formed by ion–dipole interaction with four water molecules and six amino acid residues of lectin. The glucose molecule is fixed by six hydrogen bonds with Asp81, Gly99, Asn125, Ala217, and Glu218. The van der Waals contacts with the side chains of the Phe123 and Ala80 residues additionally stabilize the monosaccharide position, albeit only slightly.

**Key words:** pea lectin, crystal complex, X-ray diffraction analysis, carbohydrate-binding specificity of lectin.