



УДК 577.154.26

ЗНАЧЕНИЕ ГИСТИДИНА ДЛЯ АКТИВНОСТИ β-1,3-ГЛЮКАНАЗЫ IV ИЗ *SPISULA SACHALINENSIS*

Еляксова Л. А., Светашева Т. Г., Лакизова И. Ю.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра Академии наук СССР, Владивосток

Методом химической модификации продемонстрирована роль гистидина в каталитической активности β-1,3-глюканазы IV из *S. sachalinensis*. Показано, что фотоинаktivация в присутствии рибофлавина имеет типичную для модификации гистидина рН-зависимость. Анализ УФ-спектров фотоинаktivации фермента в присутствии бенгальского розового при рН 7,5 показал характерное для фотоокисления гистидина увеличение поглощения в области 235—250 нм. Фотоокисление 1—2 остатков гистидина вызывает 50—70% ингибирование фермента.

Обнаруженное ингибирование β-1,3-глюканазы диэтилпирокарбонатом также обусловлено модификацией гистидиновых остатков, что подтверждено спектрофотометрически. Гидроксиламин частично восстанавливает активность инаktivированного диэтилпирокарбонатом фермента. Субстрат защищает фермент от фотоинаktivации и инаktivации под действием диэтилпирокарбоната.

Все вышеприведенные данные подтверждают возможное участие гистидина в активном центре β-1,3-глюканазы.

Как было выяснено на основе изучения влияния рН на кинетические параметры β-1,3-глюканазы IV, выделенной [1] из морского моллюска *S. sachalinensis*, каталитическая активность фермента контролируется ионизацией двух групп с рК 6,8 и 4. Первая из них может быть имидазольной группой гистидина, что определило постановку задачи данной работы. Аминокислотным анализом установлено наличие 10 остатков гистидина в молекуле β-1,3-глюканазы IV.

Ответственность гистидина за ферментативную активность показана для нескольких α-амилаз [3, 4], целлюлазы [5], рибонуклеазы [6] и предположительно для гликозидаз [7] и амилаз [8].

Для химической модификации гистидина в белках широко используют фотоокисление, причем непременным условием для фотоокисления гистидина является наличие непротонированной формы имидазольного кольца, что имеет место при рН 6 и выше [9, 10].

Мы проводили фотоокисление β-1,3-глюканазы в присутствии двух сенсibilизаторов — рибофлавина и бенгальского розового. Оказалось, что фотоокисление сопровождается быстрой инаktivацией фермента. Фотоокисление в присутствии рибофлавина при рН 7,2 вызывает быструю инаktivацию фермента, при рН 4,5 процесс идет медленнее (рис. 1), т. е. фотоинаktivация имеет характерную [9, 10] для фотоокисления гистидина рН-зависимость (рис. 2, 3). В присутствии бенгальского розового зависимость фотоинаktivации от рН выглядит различно при варьировании соотношения сенсibilизатор — белок (рис. 2). Это позволило предположить, что при фотоокислении β-1,3-глюканазы с бенгальским розовым

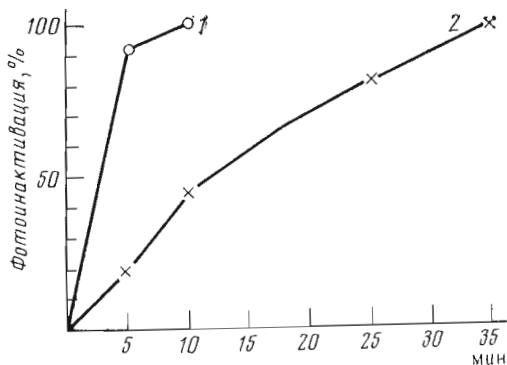


Рис. 1

Рис. 1. Фотоинактивация β -1,3-глюканазы в присутствии рибофлавина (60 мкг/мл) при рН 7,2 (1) и 4,5 (2)

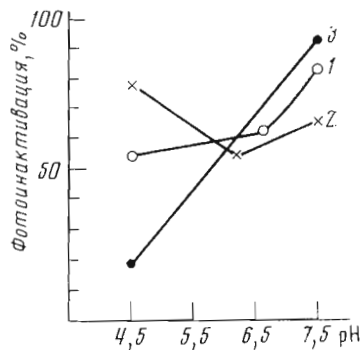


Рис. 2

Рис. 2. рН-зависимость скорости фотоинактивации β -1,3-глюканазы в присутствии бенгальского розового в концентрациях 20 (1), 40 мкг/мл (2) и рибофлавина (3). Время облучения для 1, 2, 3—40, 12 и 5 мин

при различных величинах рН может разрушаться не только гистидин, но и другие аминокислоты, возможно триптофан, важная роль которого в фермент-субстратном связывании была нами предположена ранее [11].

Для идентификации остатков, фотоокисление которых вызывало инактивацию фермента, использовали УФ-спектрофотометрический анализ процесса. Сопоставление дифференциальных спектров фотоокисления β -1,3-глюканазы в присутствии бенгальского розового (рН 7,5) показывает характерное [9, 10] для фотоокисления гистидина увеличение поглощения в области 235—250 нм (рис. 3, а). В дифференциальных спектрах фотоокисления фермента при рН 4,5 (рис. 3, б) наблюдалось уменьшение поглощения в области 280 нм, свидетельствующее об окислении остатков триптофана [10, 12]; в области 235—250 нм отсутствовал характерный пик. Близкая зависимость обнаружена при фотоинактивации папаина, вызываемой фотоокислением не только гистидина, но и триптофана [12].

Таким образом, было выяснено, что фотоокисление ламинарипазы при рН 7,5 и 4,5 в присутствии бенгальского розового было направлено на модификацию различных аминокислотных остатков — гистидина и триптофана соответственно. Возможно, это и объясняет отсутствие ясно выраженной рН-зависимости фотоокисления с бенгальским розовым. По-видимому, при рН 4,5 в условиях фотоокисления (рис. 2, 2) ингибирование могло происходить за счет разрушения остатков триптофана.

Для расчета количества модифицированных фотоокислением остатков гистидина в молекуле фермента было использовано эмпирическое уравнение [10, 13], учитывающее увеличение оптической плотности раствора белка в области 245 нм. Контрольный аминокислотный анализ фермента (фотоокисленного в присутствии бенгальского розового при рН 7,2) подтвердил правомерность применения этой формулы для наших расчетов.

Оказалось, что при фотоокислении 1—2 остатков гистидина происходило 50—70% ингибирование фермента. Наибольшее возможное число фотоокисленных остатков гистидина в молекуле β -1,3-глюканазы достигало 7.

В том случае, когда гистидин входит в активный центр фермента, можно ожидать, что субстрат будет защищать фермент от фотоокисления. Действительно (рис. 4), ферментативная активность ламинарипазы предохранялась ламинарином от фотоинактивации.

Другим наиболее избирательным методом химической модификации гистидиновых остатков в белках является реакция с диэтилпиروкарбонатом [14]. Как видно из рис. 5, диэтилпирокарбонат ингибирует β -1,3-

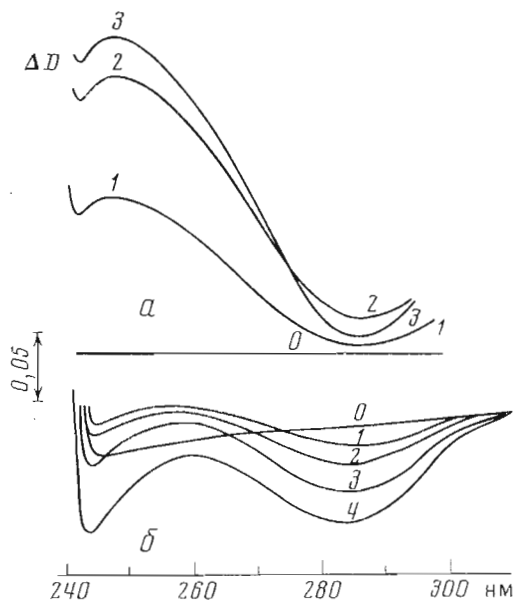


Рис. 3

Рис. 3. Дифференциальные УФ-спектры фотоокисления β -1,3-глюканазы в присутствии бенгальского розового при pH 7,5 (а) и 4,5 (б). 0 — нулевая линия; 1, 2, 3, 4 — после 5, 10, 15, 20 мин фотоокисления

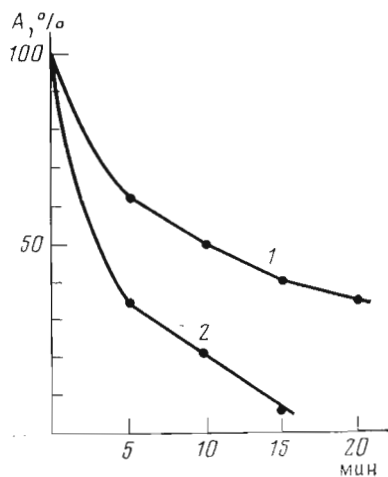


Рис. 4

Рис. 4. Фотоокисление β -1,3-глюканазы при pH 7,2 с бенгальским розовым (20 мкг/мл) в присутствии 330 мг/мл ламинарина (1) и в его отсутствие (2)

глюканазу IV. Одновременно с измерением падения активности осуществлялся УФ-спектрофотометрический контроль этого процесса. На дифференциальных спектрах отразилось типичное для образования карбэтокси-гистидина [14, 15] увеличение поглощения в области 230—250 нм (рис. 6). Изменений в области 280—290 нм, которые расшифровывают как результат модификации диэтилпирокарбонатом тирозиновых остатков [6, 16], отмечено не было. Дифференциальные спектры процесса карбэтоксилирования фермента при различных величинах pH были аналогичными и фиксировали изменения только в области 230—250 нм (рис. 6). Итак, инактивация ламинариназы под действием диэтилпирокарбоната сопровождалась только модификацией гистидиновых остатков фермента.

Для расчета числа модифицированных диэтилпирокарбонатом остатков гистидина воспользовались формулой, основанной на увеличении оптической плотности раствора белка при 240 нм, с ϵ 3600 см^{-1} [17]. Как видно из рис. 7, количество модифицированных остатков гистидина увеличивается с возрастанием pH. При pH 6,8 можно модифицировать почти все остатки гистидина (9 из 10). При одинаковых значениях pH наблюдалось увеличение количества модифицированных остатков с возрастанием молярного избытка диэтилпирокарбоната (рис. 7).

Известно, что, если диэтилпирокарбонатом модифицирован только гистидин, возможна реактивация фермента под действием гидросиламина [18]. Действительно, удалось реактивировать β -1,3-глюканазную активность при взаимодействии инактивированного фермента с гидросиламином; полностью инактивированный при pH 6 фермент восстанавливал свою активность до 50% от исходной. Одновременно наблюдалось исчезновение в дифференциальных УФ-спектрах пика с максимумом при 240 нм (рис. 6), хотя некоторое поглощение в этой области спектра сохранялось. Реактивация осуществлялась тем полнее, чем меньше была степень модификации

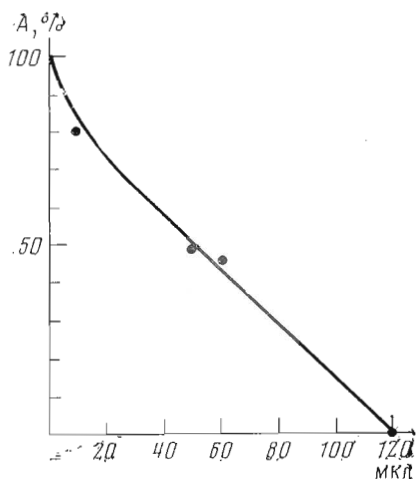


Рис. 5

Рис. 5. Инактивация β -1,3-глюканазы 2% раствором диэтилпирокарбоната при pH 6

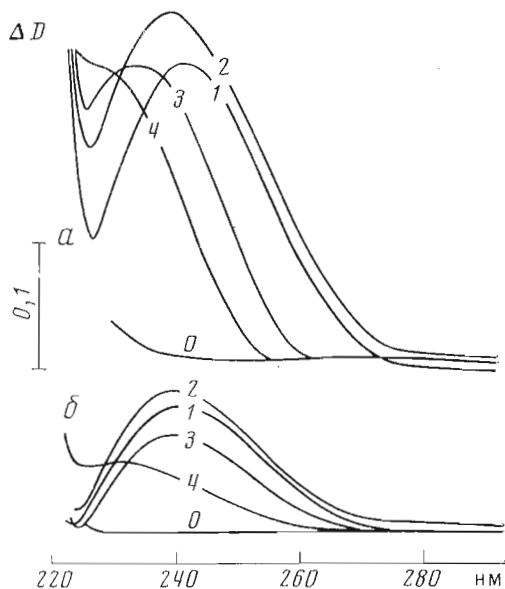


Рис. 6

Рис. 6. Дифференциальные УФ-спектры β -1,3-глюканазы, модифицированной диэтилпирокарбонатом при pH 6 (а) и 5 (б).
0 — нулевая линия, 1, 2 — после прибавления соответственно 20, 40 мкл раствора реагента, 3, 4 — реактивация после добавления гидроксилamina

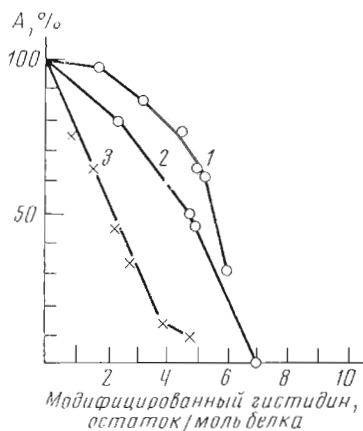


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость ферментативной активности от количества остатков гистидина, модифицированных в молекуле β -1,3-глюканазы диэтилпирокарбонатом. 1, 2 — при pH 6; конечные точки соответствуют добавлению 350- и 500-кратного избытка реагента, 3 — модификация при pH 5 с 800-кратным избытком реагента

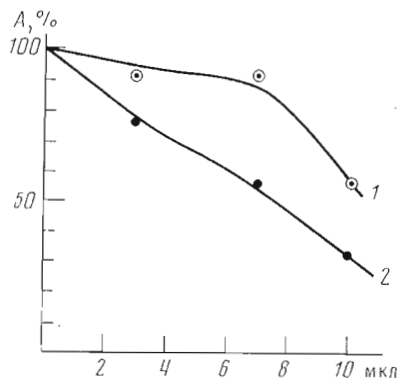


Рис. 8

Рис. 8. Инактивация β -1,3-глюканазы диэтилпирокарбонатом в присутствии 1 мг/мл субстрата (1) и в его отсутствие (2)

фермента. Так, инактивированный при pH 5 фермент удалось реактивировать на 70%.

Возможность реактивации свидетельствует в пользу модификации в составе β -1,3-глюканазы именно гистидина. Некоторая необратимая инактивация может быть объяснена либо конформационными изменениями молекулы (о чем свидетельствует измененный вид УФ-спектра), которые, вероятно, тем больше, чем больше степень модификации фермента, либо

необратимой модификацией гистидина. По-видимому, при модификации фермента диэтилпирокарибонатом в небольшой степени шел процесс образования дикарбэтоксипроизводного, действие гидроксилamina на которое не приводит к регенерации гистидина [19].

Как и в случае фотоокисления, ясно видна защита фермента субстратом от инактивирующего действия диэтилпирокарибоната (рис. 8). В присутствии субстрата модифицируется приблизительно на 1 остаток гистидина меньше, чем в его отсутствие.

Таким образом, все вышеприведенные данные подтверждают участие гистидина в активном центре β -1,3-глюканазы IV.

Экспериментальная часть

β -1, 3-глюканазу IV (эндо- β -1,3-глюканглюканогидролаза, КФ 3.2.1.6) получали из кристаллического стебелька двустворчатого моллюска *S. sachalinensis* [1]. Фермент после концентрирования на SE-сефадексе ($1,8 \times 20$ см; колонка уравновешена 0,05 М сукцинатам буфером, рН 5,2, элюция 0,5 М NaCl) обессоливали или переводили в буфер нужного рН на колонке с сефадексом G-25 (3×57 см). Концентрацию фермента в растворе определяли спектрофотометрически. Оптическая плотность при 280 нм 0,1% раствора β -1,3-глюканазы составляла 1 ОЕ.

Активность фермента (А) определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [20], используя в качестве стандарта глюкозу. Ламинарин получали из бурой водоросли *L. cycharioides* по описанному методу [21].

Реагенты. Использовали диэтилпирокарибонат (Koch-Light, Англия), сенсibilизаторы: бенгальский розовый (Veb Laborchemie Apolda, ГДР), рибофлавин (Reanal, Венгрия). Все спектрофотометрические определения проводили на спектрофотометре СФ-16. Дифференциальные спектры записывали на двухлучевом спектрофотометре фирмы Shimadzu, MPS-5000 (Япония).

Фотоокисление β -1,3-глюканазы IV. а) В присутствии рибофлавина (рис. 1): к 0,11 мг фермента в 3 мл 0,2 М ацетатного (рН 4,5) или фосфатного (рН 7,2) буфера добавляли 0,3 мл раствора рибофлавина (конечная концентрация 60 мкг/мл).

б) В присутствии бенгальского розового: к 0,18 мг фермента в 3 мл 0,2 М ацетатного или фосфатного буфера соответствующего рН добавляли 0,1 мл сенсibilизатора (конечная концентрация 20 или 40 мкг/мл) (рис. 2).

в) В присутствии ламинарина: к 0,11 мг фермента в 3 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,2) добавляли бенгальский розовый и ламинарин до конечных концентраций 20 и 330 мкг/мл соответственно. Кювета сравнения содержала те же растворы, но без ламинарина. Обе кюветы облучали одинаково и после облучения отбирали аликвоты раствора (25 мкл) для определения активности. Результаты приведены на рис. 4.

Смеси облучали слайдовым проектором ЛЭТИ с лампой мощностью 400 Вт, образец помещали в 22 см от линзы. Через определенные интервалы отбирали аликвоты (25 мкл) для определения остаточной активности.

г) УФ-спектрофотометрический анализ процесса фотоокисления β -1,3-глюканазы IV в присутствии бенгальского розового (рис. 3).

Фотооблучение фермента проводили в 1-см кварцевой кювете при комнатной температуре. К 0,48 мг фермента в 2 мл буфера соответствующего рН (4,5 или 7,5) добавляли сенсibilизатор (конечная концентрация 25 мкг/мл). Производили дифференциальную запись изменений, происходящих в процессе фотооблучения, используя четырехкюветную систему. Кювета 1 — облучаемый раствор фермента в буфере определенного рН с сенсibilизатором; 2 — необлучаемый буферный раствор с сенсibilизатором той же концентрации; кюветы сравнения: 3 — раствор фермента с сенсibilизатором в тех же концентрациях, что и в кювете 1, но необлучаемый;

4 — облучаемый буферный раствор с сенсibilизатором в той же концентрации, что и в кювете 1. Одновременно отбирали аликвоты раствора (10 мкл) для определения остаточной активности фермента. Для расчета количества модифицированных остатков гистидина в молекуле фермента было использовано эмпирическое уравнение [13]:

$$\frac{His_t}{His_0} = 1,4 \cdot \frac{D_{280}}{D_{245}} = 0,52,$$

где His_0 и His_t — первоначальное и оставшееся не разрушенным при облучении в течение данного времени количества гистидина (в молях); D_{280} и D_{245} — значения оптической плотности растворов белка при 280 и 245 нм.

Действие диэтилпирокарбоната.

а) Инактивация β -1,3-глюканазы диэтилпирокарбонатом (рис. 5). К 0,5 мг фермента в 2 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 6) добавляли по 10 мкл раствора (2%, или 0,12 М) диэтилпирокарбоната в этаноле. Смесь выдерживали после каждого прибавления по 5 мин при комнатной температуре, после чего отбирали аликвоту (10 мкл) для определения остаточной активности фермента.

б) Модификация фермента диэтилпирокарбонатом в присутствии субстрата. К 0,11 мг фермента в 3 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 5) добавляли 2% раствор диэтилпирокарбоната и ламинарин до конечной концентрации 1 мг/мл. Контрольный опыт проводился аналогично, но в отсутствие ламинарина. Отбирали аликвоты раствора (10 мкл) для определения остаточной активности. Результаты приведены на рис. 8.

в) Количественная модификация фермента диэтилпирокарбонатом (рис. 7). К 0,4—0,6 мг фермента в 2 мл 0,05 М фосфатного (рН 6) или ацетатного (рН 5) буфера добавляли по 10—30 мкл раствора диэтилпирокарбоната в этаноле (2%). Для определения остаточной активности периодически отбирали аликвоты (10 мкл). Для восстановления активности добавляли 0,1 мл 0,2 М раствора гидроксиламина к инактивированному ферменту и определяли активность фермента в аликвоте раствора после 30-минутного стояния реакционной смеси при комнатной температуре.

Одновременно в течение процесса модификации производили запись дифференциальных спектров (показаны на рис. 6) с применением четырехкюветной системы: кювета 1 — фермент с добавлением раствора диэтилпирокарбоната; 2 — буфер с добавлением соответствующего количества этанола без модификатора; 3 — фермент той же концентрации, что и в кювете 1, но с добавлением этанола; 4 — буфер с добавлением такого же количества раствора диэтилпирокарбоната, что и в кювете 1. Расчет количества модифицированных остатков гистидина проводили по формуле

$$n = \frac{\Delta D_{280} M 2}{P \cdot 3600},$$

(P — количество фермента в 1 мг, M 22 000 [1], 2 — объем кюветы в мл), используя молярный коэффициент экстинкции, равный 3600.

1. Sova V. V., Elyakova L. A. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 258, 219—227.
2. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н. (1975) *Биоорганическая химия*, 1, 1470—1473.
3. Tomita G., Kim S. S. (1964) *Experientia*, 22, 27—28.
4. Aoshima H., Manabe T., Hiromi K., Hatano H. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 341, 497—504.
5. Pettersson G. (1968) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 126, 776—784.
6. Sato S., Uchida T. (1975) *J. Biochem.*, 77, 795—800.
7. Day P. M., Pridhan J. B. (1972) *Advances enzymol. and related subjects biochem.*, 36, 91—130.
8. Greenwood C. T., Milne E. A. (1968) *Advances Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 23, 282—366.

9. Murachi T., Tsudzuki T., Okumura K. (1975) *Biochemistry*, 14, 249—255.
10. Кобылянская К. Р., Кочетов Г. А. (1971) *Успехи биол. химии*, 12, 97—118.
11. Елякова Л. А., Сова В. В., Светашева Т. Г., Лакисова И. Ю. (1976) *Биоорг. химия*, 2, 90—97.
12. Okumura K., Murachi T. (1975) *J. Biochem.*, 77, 913—918.
13. Friedrich P., Polgar L., Szabolsci G. (1964) *Acta physiol. Acad. sci. hung.*, 25, 217—225.
14. Ovádi J., Libor S., Elödi P. (1967) *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*, 2, 455—458.
15. Miles E. W., Kumagai H. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 2843—2851.
16. Burstein Y., Walsh K. A., Neurath H. (1974) *Biochemistry*, 13, 205—210.
17. Holbrook J. J., Ingram V. A. (1973) *Biochem. J.*, 131, 729—738.
18. Melchior W. D., Farney D. (1970) *Biochemistry*, 13, 205—210.
19. Аваева С. М., Краснова В. И. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 1600—1605.
20. Nelson N. (1944) *J. Biol. Chem.*, 153, 375—381.
21. Black V. A. P. (1969) *Methods in Carbohydr. Chemistry*, 5, pp. 159—161. Acad. Press, N. Y.—London.

Поступила в редакцию
20.VII.1976

После доработки
7.X.1976

HISTIDINE IMPLICATION IN THE ACTIVITY OF β -1,3-GLUCANASE IV FROM *SPISULA SACHALINENSIS*

ELYAKOVA L. A., SVETASHEVA T. G., LAKISOVA I. Yu.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science
Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Chemical modification has demonstrated the possible role of a histidine residue in catalytical activity of β -1,3-glucanase IV from *Sp. sachalinensis*. Riboflavin-sensitized photoinactivation of the enzyme was shown to manifest the pH dependence which is characteristic of histidine modification. In the UV-spectra taken in the course of Rose Bengal mediated photoinactivation at pH 7.5, an enhanced absorption in 235-250 nm range could be discerned which is attributed to histidine oxidation. Photooxidation of 1-2 histidine residues results in 50-70 per cent inhibition of enzymatic activity. The observed inhibition of β -1,3-glucanase by diethylpyrocarbonate is also associated with histidine modification, which is substantiated by spectrophotometry. The enzymatic activity lost on diethylpyrocarbonate treatment is partially restored by adding hydroxylamine. The protecting effect of the substrate was observed both for photoinactivation reaction and diethylpyrocarbonate modification. All the above data are interpreted as substantiating possible involvement of histidine in the active site of β -1,3-glucanase.