



УДК 577.154.26

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ
ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА β -1,3-ГЛЮКАНАЗЫ IV
ИЗ МОРСКОГО МОЛЛЮСКА *SPISULA SACHALINENSIS****Елякова Л. А., Улькина Ж. И., Глебко Л. И.**Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра Академии
наук СССР, Владивосток*

Показано, что β -1,3-глюканаза из морского моллюска *S. sachalinensis* содержит 3 остатка тирозина. Проведено спектрофотометрическое титрование фермента, определены кажущиеся pK всех 3 остатков (pK_1 11,0, pK_2 11,6, pK_3 12,3). Из сопоставления данных спектрофотометрического титрования и реакционной способности остатков тирозина по отношению к тетранитрометану высказано предположение о различной степени погруженности остатков в молекуле фермента. Проведено спектрофотометрическое титрование моно-, ди- и триптропроисводных β -1,3-глюканазы. Показано, что нитрование сопровождается постепенным падением активности фермента, зависящим от избытка тетранитрометана. Присутствие субстрата и его аналога не влияет на степень нитрования β -1,3-глюканазы. Эти данные позволяют исключить участие тирозиновых остатков в активном центре фермента; инактивация при нитровании вызывается, по-видимому, конформационными изменениями молекулы.

Известно, что тирозин относится к числу наиболее реакционноспособных аминокислот и нередко играет важную роль в каталитической деятельности ферментов [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния остатков тирозина и выяснение их значения в ферментативной активности β -1,3-глюканазы (эндо- β -1,3-глюканглюканогидролаза, КФ 3.2.1.6, ламинариназа IV) из морского моллюска *S. sachalinensis*.

Для определения общего количества остатков тирозина использовали спектрофотометрический метод [2]. Из сравнения спектров β -1,3-глюканазы (рис. 1) в растворе уксусной кислоты (1) и щелочи (2) видно, что в спектре фермента в 0,1 н. NaOH появляются два характеристических максимума при 283 и 293 нм. Из тангенса угла наклона касательной к этим максимумам молярное соотношение тирозина и триптофана соответствует 0,7 (см. «Экспер. часть»). Исходя из этой величины, а также из значения наибольшего максимума поглощения (283 нм), можно предположить наличие 3 остатков тирозина и 4 остатков триптофана. Последнее значение соответствует числу остатков триптофана, определенных ранее [3].

Общее количество остатков тирозина было рассчитано также из кривой спектрофотометрического титрования β -1,3-глюканазы при 295 нм в присутствии гуанидинхлорида (рис. 2, 1) и значения молярного коэффициента поглощения ϵ 25 000 при 283 нм в 0,1 н. NaOH (рис. 1, 2) [4]. Общее изменение $\Delta\epsilon$ при 295 нм составило 8520. Принимая $\Delta\epsilon$, соответствующее ионизации свободного тирозина, равным 2400 [5], свободного

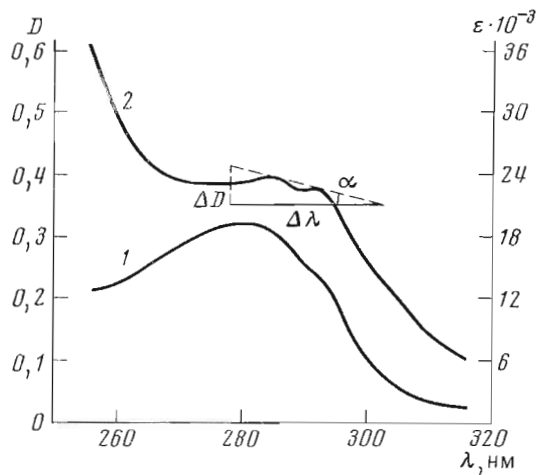


Рис. 1. Спектрофотометрическое определение остатков тирозина и триптофана [2] в β -1,3-глюканазе. Спектр β -1,3-глюканазы в 0,02 М уксусной кислоте (1) и в 0,1 н. NaOH (2)

триптофана — 491 [6], а значение ϵ при 280 нм в 0,1 н. NaOH для этих остатков 1576 и 5225 соответственно [7], можно составить два уравнения:

$$2400x + 491y = 8520,$$

$$1576x + 5225y = 25\ 000,$$

где x — общее число остатков тирозина, y — общее число остатков триптофана.

Рассчитанные значения x и y составили 2,73 и 3,93, что хорошо согласуется с определением по методу [2] и подтверждается данными аминокислотного анализа, показавшего содержание 3 остатков тирозина и 4 остатков триптофана.

Как известно, состояние тирозиновых остатков характеризуется кривой спектрофотометрического титрования ферментов в нативной форме [8]. Нами было проведено спектрофотометрическое титрование β -1,3-глюканазы в растворе 0,02 н. уксусной кислоты с ионной силой 0,2 в присутствии 0,5% раствора немоногенного детергента бридж-35, который, как было установлено, предупреждает выпадение в осадок фермента в среде с $\text{pH} > 8$. Как видно из рис. 2, 2, ионизация остатков тирозина β -1,3-глюканазы проходит в три стадии: I стадия между pH 10—11, II — между pH 11—12 и III при $\text{pH} > 12$. Ионизация первого остатка начинается только при $\text{pH} > 10$ и характеризуется достаточно высоким значением pK — 11. Второй остаток ионизируется при $\text{pH} > 11$ и имеет также высокое значение pK , равное 11,6. Поскольку ионизация свободного тирозина происходит в пределах pH 9 — 9,5 [9], можно предположить, что в β -1,3-глюканазе 2 остатка тирозина в различной степени скрыты внутри молекулы и становятся доступными растворителю лишь после того, как фермент претерпевает частичные конформационные изменения в результате изменения pH . Третий тирозиновый остаток ионизируется при $\text{pH} > 12$ и имеет pK 12,3. Этот остаток, по-видимому, наиболее глубоко погружен в гидрофобную область β -1,3-глюканазы и становится доступным только после полной денатурации фермента.

Спектрофотометрическое титрование β -1,3-глюканазы в присутствии 6 М гуанидинхлорида (рис. 2) дает 3,5 остатка тирозина с нормальными значениями pK 9,9, соответствующими ионизации свободного тирозина. Таким образом, под влиянием гуанидинхлорида происходит, вероятно,

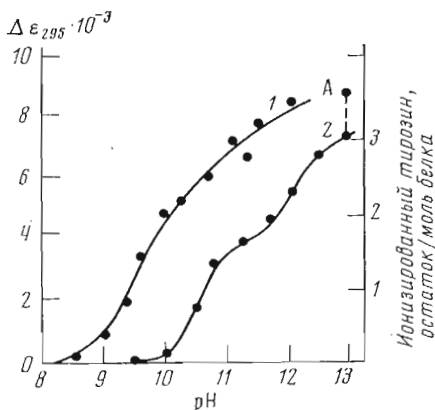


Рис. 2

Рис. 2. Кривая спектрофотометрического титрования (295 нм) нативной β-1,3-глюканазы (2) (0,02 М уксусная кислота, 0,5% бридж-35, 0,2 М KCl) и β-1,3-глюканазы в присутствии 6 М гуанидинхлорида (1). Концентрация фермента $1,6 \cdot 10^{-5}$ М. Точка А получена через 24 ч

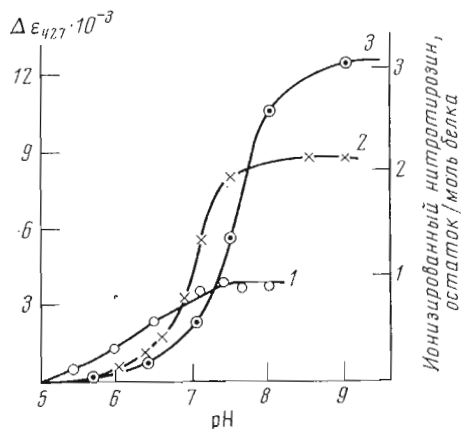


Рис. 3

Рис. 3. Кривые спектрофотометрического титрования (427 нм) моно- (1), ди- (2) и тринитрозамещенной (3) β-1,3-глюканазы. Концентрация фермента $(1,3-1,8) \cdot 10^{-5}$ М в 0,02 М ацетатном буфере (рН 5), 0,5% бридж-35, 0,2 М KCl

развертывание молекулы фермента, что освобождает все остатки тирозина, тем самым нормализуя их рК.

Через 24 ч при рН 13 на кривой 2 рис. 2 наблюдается прирост оптической плотности (точка А), соответствующий 3,6 остатка тирозина. Такой прирост, однако, может быть вызван изменением поглощения дисульфидных мостиков [10].

Для сопоставления данных спектрофотометрического титрования и химической реакционности остатков тирозина, а также для выяснения значения их остатков в каталитической деятельности фермента была исследована реакция β-1,3-глюканазы с тетранитрометаном [11, 12]. Введение нитрогруппы в орто-положение к фенольному гидроксилу тирозина вызывает смещение максимума в видимой области его спектра с 360 к 427 нм при рН > 6. Поглощение при 427 нм использовалось для количественного определения степени нитрования фермента. Кроме того, степень нитрования контролировалась данными аминокислотного анализа по исчезновению тирозина и возрастанию нитротирозина.

Остатки тирозина β-1,3-глюканазы обладают слабой реакционной способностью в условиях опыта и нитруются неодинаково (таблица). Для

Модификация β-1,3-глюканазы IV тетранитрометаном

№ п.п.	Избыток тетранитрометана, моль/моль белка	Количество модифицированных остатков, Туг/моль белка	Активность, %
1	10	0	100
2	20	0	100
3	40	0,8-0,96	30-35
4	50	1,3-1,45	25-30
5	60	1,75-2,15	10-15
6	100	1,97-2,00	0
7	300	1,85-1,94	0
8	100 в 8 М мочеvine	2,0-2,14	0
9	300 в 8 М мочеvine	2,84-3,01	0

нитрования только одного, наиболее реакционноспособного остатка требуется 40-кратный молярный избыток тетранитрометана, для нитрования 2 остатков — 60-кратный, третий же нитруется лишь с 300-кратным избытком реагента в присутствии 8 М мочевины.

Таким образом, прослеживается соответствие между затрудненностью последовательной химической модификации остатков тирозина β -1,3-глюканазы и ионизацией этих остатков в условиях спектрофотометрического титрования.

Для определения кажущихся pK остатков нитротирозина в модифицированной β -1,3-глюканазе было проведено спектрофотометрическое титрование, основанное на изменении поглощения при 427 нм (рис. 3). Для остатка нитротирозина монозамещенного фермента было получено аномально низкое значение pK — 6,3, почти на 0,6 единицы меньшее, чем pK 3-нитротирозина [12]. Это значение, однако, выравнивалось до нормального (6, 9) при последующем нитровании до динитропроизводного β -1,3-глюканазы, причем величина pK второго остатка нитротирозина соответствовала 7,4, что не согласовалось с затрудненностью его ионизации и нитрования. Это позволило предположить конформационные изменения в β -1,3-глюканазе, вызванные большим избытком тетранитрометана. В пользу такого допущения говорит тот факт, что pK нитротирозил тринитропроизводного фермента нормальны и равны 7 (рис. 3). Возможность конформационных изменений в присутствии тетранитрометана была ранее показана, например, для лизоцима [13].

Изменение активности β -1,3-глюканазы в зависимости от степени нитрования (таблица) свидетельствует о том, что нитрование вызывает медленную, постепенную инактивацию фермента. Поэтому прямое участие остатков тирозина в каталитической активности может быть исключено. Видна также зависимость степени инактивации фермента от избытка тетранитрометана, хотя степень модификации остатков тирозина при этом не увеличивается (опыты 5—7, таблица). По-видимому, избыток реагента способствует разрушению активной конформации β -1,3-глюканазы.

Присутствие субстрата не предохраняет фермент от инактивации. Как в присутствии субстрата и его аналога (ламинарибиозы), так и в отсутствие их количество нитрованных остатков тирозина было одинаковым.

Таким образом, тирозиновые остатки β -1,3-глюканазы не существенны для активности фермента. Инактивация фермента обусловлена, возможно, конформационными эффектами, вызванными избытком тетранитрометана.

Экспериментальная часть

Гомогенная β -1,3-глюканаза (M 22 000) была выделена из морского моллюска *S. sachalinensis* и очищена согласно описанной ранее методике [14]. После концентрирования на SE-сефадексе ($1,8 \times 20$ см, колонка уравновешена 0,05 М сукцинатным буфером, pH 5,2; элюирование 0,5 М NaCl) фермент обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (3×57 см) в 0,02 М уксусной кислоте. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, исходя из того, что оптическая плотность 0,1% раствора при 280 нм составляла 1 ОЕ.

Активность β -1,3-глюканазы определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [15]. Ламинарин получали из бурой водоросли *Laminaria cycharioides* по методу [16], ламинарибиозу — гидролизом ламинарина 0,25 н. H_2SO_4 с последующим разделением на угле-целите. Гуанидинхлорид марки ч. перекристаллизовывали из абсолютного этанола и проверяли на чистоту по методу [18]. Использовали 0,084 М раствор тетранитрометана (Serva, ФРГ) в 96% этаноле.

Спектры нативного и денатурированного фермента записывали на двухлучевом спектрофотометре (Shimadzu, MPS-5000, Япония). Расчет

возможного количества остатков тирозина и триптофана в β -1,3-глюканазе осуществляли по методу [2]:

$$\lg \alpha = \frac{\Delta D}{\Delta \lambda} = \frac{0,06}{-24} = -0,0025; S = \frac{\lg \alpha \cdot 10^3}{D_{\max}} = -\frac{2,5}{0,4} = -6,2.$$

Из таблицы, представленной в работе [2], молярное соотношение тирозина и триптофана (R) равно 0,7, коэффициент экстинкции смеси тирозина и триптофана ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) составляет 202. На основании значений R и E рассчитано количество молей тирозина и триптофана.

Спектрофотометрическое титрование фермента (рис. 2). В измерительную кювету спектрофотометра СФ-16 помещали 2 мл раствора фермента ($1,6 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,02 М уксусной кислоте, подтитрованного до рН 6 щелочью, добавляли 0,2 мл 5% раствора бридж-35 (Calbiochem, США) и 32,5 мг КСl. В отдельном опыте в раствор фермента добавляли гуанидинхлорид до 6 М концентрации. Кювету плотно закрывали резиновой пробкой с несколькими отверстиями, через которые с помощью тонко оттянутых полиэтиленовых капилляров автобюреткой типа АВU-12 (Дания) вводили определенные количества 1 М КОН, а также инертный газ, с помощью которого содержимое кюветы перемешивали и переводили в ячейку для измерения рН. Измерение рН осуществляли с интервалами 0,3—0,5 ед. рН на рН-метре типа рН-340 (СССР). Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 295 нм против буфера через 5 мин после добавления очередной аликвоты 1 М КОН. При рН > 11 в качестве титранта использовали 4 М КОН. Общее увеличение объема титруемого раствора не превышало 2%. Предварительно ставили холостой опыт, результаты которого затем вычитали из результатов титрования фермента. Для расчета общего числа остатков тирозина использовали значение $\Delta \epsilon_{295}$, соответствующее ионизации одного остатка, равное 2400 [5]. Полученные кривые титрования обсчитывали по уравнению [17]

$$p K_{\text{наж}} = \text{pH} - \lg [\Delta \epsilon / (\Delta \epsilon_{\text{макс}} - \Delta \epsilon)].$$

Нитрование (см. таблицу). К 1 мл ($1,3—1,8$) $\cdot 10^{-5}$ М раствора фермента в 0,02 М уксусной кислоте прибавляли 1,5 мл 0,03 М фосфатного буфера (рН 8,9), что обеспечивало рН исследуемого раствора, равное 8. При необходимости готовили буфер в 8 М мочевины. Затем приливали 10—300-кратный молярный избыток тетранитрометана относительно содержания фермента. Нитрование проводили при 20°, после чего отбирали аликвоту (0,01 мл) для определения активности. По окончании реакции модифицированный фермент отделяли от избытка тетранитрометана на колонке G-25 (2×37 см), уравновешенной 0,03 М фосфатным буфером (рН 8) со скоростью элюции 20—25 мл/ч. Фракции, содержащие нитроанный фермент, объединяли, концентрировали в вакуум-эксикаторе и рассчитывали число модифицированных остатков по поглощению исследуемого раствора при 427 и 280 нм, используя молярный коэффициент экстинкции, равный 4100 [12].

Нитрование в присутствии субстрата проводили в аналогичных условиях при 60-кратном молярном избытке тетранитрометана и в присутствии 2,5 мг ламинарина. Параллельно нитровали фермент в тех же условиях, но без субстрата. В обоих случаях остаточная активность составляла $\sim 16\%$.

Спектрофотометрическое титрование модифицированного фермента (рис. 3). Раствор фермента ($(1,3—1,8) \cdot 10^{-5}$ М) после окончания нитрования загружали на колонку G-25 (2×37 см), уравновешенную 0,02 М ацетатным буфером (рН 5) и элюировали тем же буфером. Фракции, содержащие нитроанный фермент, объединяли, упаривали на роторном испарителе при 35° до объема 2 мл и помещали в измерительную кювету спек-

трофотометра СФ-16. К содержимому кюветы добавляли 0,2 мл 5% раствора бридж-35 и 37 мг КСl. Титрование проводили в пределах рН 5—9; оптическую плотность раствора измеряли при 427 нм, используя для расчета числа модифицированных остатков ϵ_{427} 4100 [12]. Ход титрования и расчет полученных кривых осуществляли так же, как при спектрофотометрическом титровании нативного фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Timasheff S. N., Gorbunoff M. J. (1967) *Annu. Rev. Biochem.*, **36**, 13—54.
2. Bensze W. L., Schmid K. (1957) *Analyt. Chem.*, **29**, 1193—1196.
3. Елякова Л. А., Сова В. В., Светашева Т. Г., Лакизова И. Ю. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 90—97.
4. Yutani A., Yutani K., Isemura T. (1969) *J. Biochem.*, **65**, 201—208.
5. Fujioka H., Imahori K. (1963) *J. Biochem.*, **53**, 244—249.
6. Ohta Y., Ogura Y., Wada A. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5919—5925.
7. Goodwin T. W., Morton R. A. (1946) *Biochem. J.*, **40**, 628—631.
8. Wetlaufer D. B. (1962) *Advan. Protein Chem.*, **17**, 303—395.
9. Martin R. B., Edsall Y. T., Wetlaufer D. B., Hollingworth B. R. (1958) *J. Biol. Chem.*, **233**, 1429—1435.
10. Combarous Y., Maghuin-Rogister G. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **42**, 7—12.
11. Sokolovsky M., Riordan J. F., Vallee B. L. (1966) *Biochemistry*, **5**, 3582—3589.
12. Riordan J. F., Sokolovsky M., Vallee B. L. (1967) *Biochemistry*, **6**, 358—361.
13. Atassi M. Z., Habeeb F. S. A. (1969) *Biochemistry*, **8**, 1385—1393.
14. Sova V. V., Elyakova L. A. (1972) *Biochim et biophys. acta*, **258**, 219—227.
15. Nelson N. (1944) *J. Biol. Chem.*, **153**, 375—381.
16. Black V. A. P. (1969) *Methods in Carbohydr. Chemistry*, **5**, pp. 159—161, Acad. Press., N. Y.—London.
17. Tojo T., Hamaguchi K., Imanishi M., Amano T. (1966) *J. Biochem.*, **60**, 538—542.
18. Nozaki Y. (1972) *Methods in Enzymology*, **24**, 43—50.

Поступила в редакцию
29.VII.1976

После доработки
8.X.1976

SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF THE STATE OF TYROSYL RESIDUES OF β -1,3-GLUCANASE IV FROM THE MARINE MOLLUSC *SPISULA SACHALINENSIS*

ELYAKOVA L. A., ULKINA Zh. I., GLEBKO L. I.

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

β -1,3-Glucanase from the sea mollusc *S. sachalinensis* was shown to contain three tyrosyl residues. The enzyme was spectrophotometrically titrated and the apparent pK of all three residues (pK₁ 11.0; pK₂ 11.6; pK₃ 12.3) were estimated. Basing on comparison of the spectrophotometric titration data and reactivity of the tyrosyl residues towards tetranitromethane, the suggestion was made that these residues are buried within the enzyme molecule to a different degree. The mono-, di-, and trinitro derivatives of β -1,3-glucanase were also studied by spectrophotometric titration. Nitration was shown to be accompanied by gradual decline in enzymatic activity, depending on excess tetranitromethane. The substrate and its analog did not affect the degree of β -1,3-glucanase nitration. These data are interpreted as ruling out involvement of tyrosyl residues in the active site; the inactivation is thought to be caused by conformational changes in the molecule.