



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.154.36.02 : 543.544.2

О СТЕРЕОХИМИИ КАТАЛИТИЧЕСКИ НЕАКТИВНОГО КОМПЛЕКСА
ЛИЗОЦИМА С ХИТИНОВЫМ СУБСТРАТОМ ПРИ pH 8,4

Черкасов И. А., Еравченко Н. А., Павловский П. Е.

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;**Московский технологический институт мясной и молочной промышленности*

Ранее нами было найдено, что лизоцим (КФ 3.2.1.17) белка куриного яйца образует с хитином два pH-зависимых типа фермент-субстратных комплексов: комплекс первого типа (ЛХ-1) образуется при pH 4,7, близком к оптимуму ферментативной активности, комплекс второго типа (ЛХ-2) — при pH 8,4, при котором фермент неактивен; при промежуточных значениях pH лизоцим распределяется между комплексами обоих типов [1]. Судя по определенным нами термодинамическим параметрам комплексообразования [2], комплекс ЛХ-1 соответствует известному комплексу лизоцима с хитотриозой, в котором сахаридная цепочка занимает, по Блэйку и сотр. [3], участки связывания А, В и С молекулы лизоцима. Комплекс ЛХ-2 включает, по нашим данным [4], по меньшей мере четырехзвенные сахаридные цепочки, однако, на каких участках происходит связывание, оставалось неизвестным. Банерджи и Рапли [5] также пришли к выводу, что хитотетраоза может образовывать с лизоцимом комплекс иного типа, чем хитотриоза, и высказали предложение, что в этом комплексе четвертое звено субстрата (восстанавливающий конец) располагается в области участка D.

С целью выяснения стереохимии комплекса ЛХ-2 нами методом аффинной хроматографии на хитине [1, 2] было исследовано сравнительное сродство к субстрату лизоцимов яичного белка курицы и индейки. Эти лизоцимы весьма близки в структурно-химическом отношении и имеют одинаковое строение активного центра, за исключением того, что остаток аспарагиновой кислоты-101 куриного лизоцима, участвующий в связывании субстрата при pH 4,7 двумя водородными связями на участках А и В, в лизоциме индейки генетически заменен остатком глицина, не дающим таких связей [6].

Как показал опыт, лизоцим индейки по способности к образованию комплексов ЛХ-1 и ЛХ-2 практически не отличается от куриного лизоцима. Так, при испытанном нами значении pH 6,4 распределение лизоцима курицы между этими комплексами составляло 79 и 21%, а лизоцима индейки — 75 и 25% соответственно.

Нами найдено, что при pH 4,7 константа сродства к субстрату K_c [1,2] у лизоцима индейки понижена в 12 раз по сравнению с куриным лизоцимом, что, очевидно, объясняется отсутствием в комплексе двух водородных связей. При pH 8,4 величина K_c также снижена, но лишь в 3

раза, что можно объяснить отсутствием только одной водородной связи, т. е. сдвигом комплекса по меньшей мере на участки В-С-D-E. Вариант, в котором заняты участки С-D-E-F (т. е. без участка В), исключается, так как в этом случае сродство к субстрату у обоих лизоцимов было бы одинаковым. Возможность! N-ацетилглюкозамином свободно занимать участок D показана недавно в работе Шиндлера и сотр. [7]. Интересно, что при рН 8,4 субстрат перекрывает каталитическую область лизоцима (между участками D и E), которая в этих условиях не функционирует.

Экспериментальная часть

В работе использовали трижды перекристаллизованный лизоцим белка куриных яиц. Лизоцим из яичного белка индейки получен по ранее описанной методике [8], его гомогенность проверена диск-электрофорезом в полиакриламидном геле.

При определении констант сродства аффинную хроматографию проводили при 25° на колонке (0,9 × 26 см) с дезаминированным хитином [8] со средним диаметром частиц 75 мкм. При рН 4,7 использовали 0,2 М натрий-ацетатный буфер, а при рН 8,4—0,15 М раствор NaHCO₃ с добавкой мочевины до 2 М. На колонку загружали по 5 мг лизоцима в 1 мл буфера и элюировали тем же буфером, фиксируя объем элюирования максимума белкового пика. Величину K_c находили, как описано ранее [1, 2]. В указанных условиях величина K_c для лизоцимов индейки и курицы при рН 4,7 составила 0,286 и 3,428, а при рН 8,4—1,714 и 5,271 соответственно.

При исследовании распределения лизоцимов между комплексами ЛХ-1 и ЛХ-2 проводили хроматографию на той же колонке и при той же загрузке ферментов в среде 0,2 М натрий-ацетатного буфера (рН 6,4) с последующим ступенчатым элюированием водой (ЛХ-1) и 0,2 М уксусной кислотой (ЛХ-2) [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1967) Молекулярн. биология, **1**, 381—390.
2. Cherkasov I. A., Kravchenko N. A. (1970) Biochim. et biophys. acta, **206**, 289—294.
3. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. (1967) Proc. Roy. Soc., ser. B, **167**, 378—388.
4. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., № 11, 2619.
5. Banerjee S. K., Rupley J. A. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., **155**, 19—23.
6. Banerjee S. K., Rupley J. A. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 8267—8274.
7. Schindler M., Assaf Y., Sharon N., Chipman D. M. (1977) Biochemistry, **16**, 423—431.
8. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1968) Биохимия, **34**, 1089—1901.
9. Черкасов И. А., Кравченко Н. А. (1967) Биохимия, **33**, 761—765.

Поступила в редакцию
13.XII.1977

После доработки
1.II.1978

ON STEREOCHEMISTRY OF THE LYSOZYME CATALYTICALLY INACTIVE COMPLEX WITH CHITINOUS SUBSTRATE AT pH 8.4

CHERKASOV I. A., KRAVCHENKO N. A., PAVLOVSKY P. E.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; Technological Institute
of Meat and Dairy Industry, Moscow*

The hen and turkey egg-white lysozyme relative affinity for chitinous substrate is examined at pH 4.7 and 8.4. At the latter pH in the enzyme-substrate complex the tetrameric substrate is believed to occupy the B-C-D-E binding subsites of the lysozyme molecule.