

О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ И СТРОЕНИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГЛЮКОАМИЛАЗЫ

© 2000 г. Т.А. Ковалева

Воронежский государственный университет

В настоящей работе показано, что глюкоамилаза имеет четвертичную структуру, состоящую из 2 субъединиц, обладающих каталитической активностью. Рассматриваются механизмы функционирования активного центра глюкоамилазы и схема внутримолекулярных превращений реакции гидролиза крахмала.

Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3, α - 1,4 глюкангидролаза) атакует только внешние нередуцирующие концы цепей полисахаридов, отщепляя последовательно мальтозные и глюкозные остатки. Известно, что грибные глюкоамилазы - это гликопротеиды, имеющие мультидоменную структуру. Фермент, выделенный из *Aspergillus awamori* Var. X 100, характеризуется наличием N-терминального домена, состоящего из 440 аминокислотных остатков, O-гликозилированного участка, имеющего 70 аминокислот и C-терминального крахмалсвязывающего домена (100 аминокислот). По данным рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,22-0,24 нм каталитический домен имеет 2 N-гликозилированных участка, причем контакт между N-гликозилированными цепями и полипептидом стабилизируется остатком маннозы с помощью водородной связи или ионизированными молекулами воды, чем и определяется стабильность фермента и возможность образования надмолекулярных структур (1,2).

Однако механизм действия ферментов на полимерные субстраты, а также особенности характера фермент-субстратных взаимодействий на достаточно протяженных участках активных центров амилаз изучены недостаточно. Поэтому основным объектом наших исследований стала глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* Г-20Х производства Ладыжинского завода ферментных препаратов. Получение гомогенного препарата осуществляли, используя метод многостадийной очистки, модифицированный в нашей лаборатории (3). Определение молекулярной массы фермента проводили с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-200 (4). Каталитическую активность глюкоамилазы определяли глюкозооксидазным методом (5). Количественное определение SH- групп осуществляли методом (6), основанным на измерении причес-

та оптической плотности в области 255 нм при присоединении n-меркурибензоата к SH-группам.

Наши эксперименты показывали, что глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* имеет четвертичную структуру, представленную димером из двух субъединиц (молекулярная масса 53,6 кДа). Поверхность O-гликозилированного домена характеризуется наличием маннозы, связанной с Ser-453, Ser-455, Ser-459 и Thr-457. Углеводные фрагменты участвуют в связывании молекул субстрата и его аналогов и локализации молекул H₂O, которые определяют взаимодействие одиночных звеньев углевода между собой и способствуют повышению стабильности фермента. O-гликозилированный домен имеет остатки Gly перед и после C-конца, которые представляют собой изгибы, определяющие взаимодействие крахмалсвязывающего домена с каталитическим и соответствующую ориентацию молекулы субстрата (7).

Используя данные рентгеноструктурного анализа Алешина А.Е. (1994) и программу MOLSCRIPT (8), показано (рис. 1), что глюкоамилаза имеет сквозную полость, в которой формируется активный центр (~1,5 нм) за счет α - α баррелей, ограниченную следующими аминокислотными остатками: Leu-58, Leu-130, Leu-177, Leu-319, Trp-178, Trp-417, Phe-187.

На обоих концах щели располагаются 2 кластера молекул воды, причем один содержит 12 молекул H₂O (в области Leu-58), другой - 7 молекул, расположенных упорядоченно. Кроме того, вблизи активного центра имеются еще 3 кластера молекул H₂O, один из которых представляет собой раздвоенную цепь, начинающуюся в двух локусах активного центра (Asp-155 и Arg-54) и сливающуюся в одиночную цепь у Thr-53. Конец данного кластера находится на поверхности молекулы (Gly-90). Два других кластера молекул H₂O

Рис. 1. Пространственная структура глюкоамилазы



отделены от раствора субстрата О-гликозильной цепью Asp-171. В состав микроокружения полости активного центра глюкоамилазы входят следующие аминокислотные остатки: карбонильная группа Asn-47, OH-группа Трг-48, Трг-52, Arg-54, Lys-108, Gln-124, Glu-173, Glu-180, Arg-305, Трг-311 (рис.1, 2).

При исследовании влияния концентрации субстрата на каталитическую активность глюкоамилазы при различных значениях pH и графической обработке экспериментальных данных в координатах ($\lg V_{max}$; pH) установлено (рис. 3), что константа ионизации pK_a функциональных групп активного центра, ответственных за каталитическое превращение молекул крахмала, соответствует pK_a карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот (2, 7).

Опыты показали (рис. 4), что п-меркурибензоат снижает каталитическую активность глюкоамилазы, причем ингибирование идет по бесконкурентному типу.

При фотоокислении имидазола гистидина молекулы глюкоамилазы в присутствии метиленового синего и без него (табл. 1) уменьшения каталитической ак-

Рис. 2. Схематическое изображение укладки полипептидной цепи глюкоамилазы



тивности глюкоамилазы не выявлено.

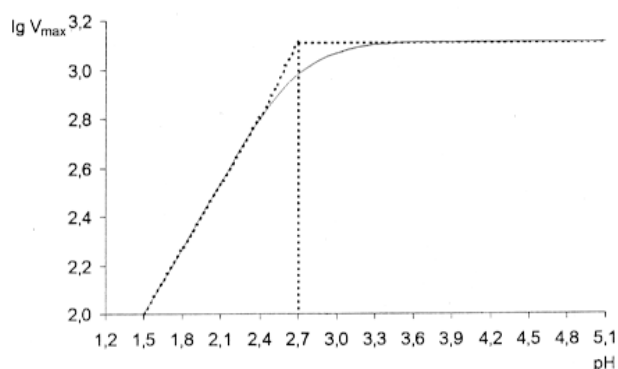
Анализ данных литературы и полученные результаты позволяют сделать заключение, что в состав каталитических групп активного центра глюкоамилазы не входят имидазольная группа гистидина и SH-группы, и в гидролизе крахмала принимают участие карбоксильные группы Asp-55, Glu-179, Glu-400, причем с одной стороны щели активного центра сосредоточены Asp-55 и Glu-179, а с противоположной - Glu-400 и Трг-120. Путем обработки данных рентгеноструктурного анализа методом молекулярной графики показано, что через полость активного центра фермента проходит кластер молекул H_2O , разделяющий ее на две половины, при изменении конформации это соотношение сдвигается.

Предполагается, что глюкоамилаза имеет достаточно протяженный участок сорбции субстрата, состоя-

Таблица 1 Влияние фотоокисления гистидина и триптофана в присутствии метиленовой сини на каталитическую активность глюкоамилазы

Время инкубации, мин	Активность глюкоамилазы, ед/мг		Достоверность отличий, P
	Без метиленовой сини	В присутствии метиленовой сини	
-	1266±30,4	1265±10,8	<0,05
10	1207±16,1	1210±22,9	<0,05
30	998±20,3	1008±16,4	<0,05
60	970±20,4	965±9,2	<0,05

Рис. 3. Зависимость $\lg V_{\max}$ от величины рН для глюкоамилазы



щий из шести подцентров связывания мономерных глюкозных звеньев и включающий в себя три каталитические карбоксильные группы. Для мальтоолигосахаридов повышение сродства по мере возрастания степени их полимеризации объясняется увеличением возможных мест взаимодействия с ферментом.

Ускорение гидролиза, по модели Хироми, объясняется увеличением доли продуктивных фермент-субстратных комплексов, в которых нередуцирующее звено молекулы субстрата занимает первый подцентр, а расщепляемая гликозидная связь располагается в непосредственной близости от каталитических групп фермента. Глюкоамилазы, продуцируемые плесневыми грибами, обычно представлены несколькими формами, различающимися по способности связывать и гидролизовать полимерные высокомолекулярные субстраты. К.И. Неустров, Л.М. Фирсов (1990) установили, что фермент синтезируется в виде одной формы - основной глюкоамилазы. В результате ограниченного протеолиза основной формы, происходящего в культуральной жидкости, образуются гомогенные минорные формы за счет отщепления пептида, содержащего дополнительный субстратсвязывающий центр (9).

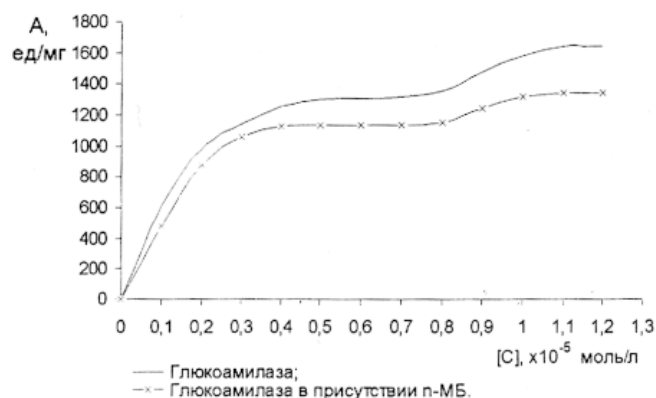


Рис. 4. Влияние п - меркурибензоата на каталитическую активность глюкоамилазы

Stoffer B. et.al. (1993) выделили каталитический домен глюкоамилазы *Aspergillus niger* путем лимитированного протеолиза пептидной связи Val-470 и Ala-471. Крахмалсвязывающий домен составляет область Ala-471 - Arg-616. Авторы считают, что *in vivo* существует активная и стабильная форма фермента с С-концом Thr-482. При локализации терминального участка в области Ser-460 фермент неустойчив, что свидетельствует о том, что структура активного центра в домене разрушается между Ser-443 и Ser-444, причем участок Ser-444 - Val-470 имеет дисульфидный мостик и взаимодействует с кластером молекул воды (7 молекул) в каталитическом домене. Крахмалсвязывающий домен (Thr-513 - Arg-616) не образует тесного контакта с каталитическим доменом, поэтому обладает значительной подвижностью (10).

Hayashida S. et.al. (1989) показали, что О-гликозилированная область участвует в разрыве водородных связей между соседними цепями в гранулярном крахмале. Крахмалсвязывающий домен определяет связывание растворимых лиганд (β -циклодекстринов) (7). Каталитический и крахмалсвязывающий домены глюкоамилазы Williamson G. (1992) рассматривает как глобулярные белки, имеющие диаметр 6 нм и 2,5 нм, причем в нативном ферменте они разделены расстоянием 10 нм. О-гликозилированный участок обуславливает взаимодействие глобул и значительную мобильность третичной структуры, а также способствует включению фермента в мембраны (11).

Гликозилирование предотвращает скопление молекул субстрата в связывающих центрах и обеспечивает стехиометрическое связывание.

По мнению ряда авторов (11,7), в связывании молекул субстрата участвует прежде всего Trp-120, входящий в состав первого подцентра. При модификации этого аминокислотного остатка с помощью генно-инженерных подходов молекула фермента утрачивала каталитическую активность. Взаимодействие с Trp-120, участвующим в формировании щели активного центра, приводит к втягиванию молекулы субстрата в щель активного центра и сопровождается искривлением гликозидной связи. Роль функциональных каталитических групп играют Glu-179, Glu-400 и Asp-55. Щель активного центра имеет нескомпенсированный отрицательный заряд, эти группы занимают определенное положение и сольватированы. Молекула субстрата, внедряясь в полость активного центра, перемещает кластер молекул воды из активного центра в менее полярную среду, что благоприятствует ионизации Glu-179. Выведение молекул воды, располагающихся в активном центре, освобождает полость активного центра для молекул субстрата.

Результаты наших экспериментов также показывают, что такие ингибиторы, как нитрат, салицилат и перхлорат дигидрохинолина эффективны потому, что, в отличие от субстрата, уменьшают отрицательный заряд активного центра.

Alechin A.E. et.al. (1994) методом рентгеноструктурного анализа определили, что 7 молекул воды связаны с подцентрами 1 и 6, из них перемещаются вместе с молекулой субстрата, покидая активный центр через узкий канал (1).

Тгр-120 играет ключевую роль в стабилизации центров связывания. При фотоокислении глюкоамилазы в присутствии метиленового синего, кроме гистидина подвергается воздействию индольное кольцо триптофана и тирозина. По нашим данным (табл.1), эти воздействия не приводят к потере каталитической активности нативного фермента. По-видимому, О-гликозилированные участки крахмалсвязывающего домена прежде всего взаимодействуют с молекулой субстрата и эффект фотоокисления практически не проявляется. При дегликозилировании глюкоамилазы и модификации Тгр-120 каталитическая активность исчезает полностью. При исследовании структуры комплекса акарбозы с глюкоамилазой, включающей 1-471 аминокислотные остатки и 535 центров связывания молекул воды, установлено, что Тгр-120 взаимодействует с подцентрами 1 и 2 и с Glu-179 при помощи водородных связей. Причем связывание глюкозного остатка с подцентром 1 не сопровождается изменением ΔG , а взаимодействие с подцентром 2 приводит к отрицательному значению ΔG , что и обуславливает независимое связывание глюкозных единиц субстрата с каждым из подцентров активного центра. Комплексообразование субстрата с «аффинным» сайтом глюкоамилазы представляет собой нелимитирующие стадии в каталитическом цикле.

Взаимодействие с подцентрами 1 и 2 способствует изменению конформации фермента. Если при направленном мутагенезе Asp-55 превращается в Asn, то глюкоамилаза теряет каталитическую активность. Мы предполагаем следующий механизм разрыва α -1,4-гликозидной связи в молекуле крахмала под действием глюкоамилазы. При образовании фермент-субстратного комплекса с участием Тгр-120 и О-гликозилированных участков крахмалсвязывающего домена происхо-

дит ионизация Asp-55 и Glu-179, причем акцептором протонов является ОН-группа передующего конца молекулы крахмала. Возможно, что Glu-179 протонирован уже в начале реакции.

Физико-химические параметры микроокружения активного центра способствуют уменьшению pK_a этого аминокислотного остатка, при этом молекула фермента не подвергается структурным изменениям. Протонирование оказывает возмущающее воздействие на электронную конфигурацию α -1,4-гликозидной связи, приводит к образованию термодинамически более выгодной конформации «полукресло».

Фермент-субстратные комплексы могут быть продуктивными и непродуктивными, причем в продуктивном комплексе молекула субстрата занимает 1-ый подцентр, а расщепляемая α -1,4-гликозидная связь располагается между каталитическими группами активного центра. Гидрофобные аминокислотные остатки, выстилающие полость центра, способствуют более жесткой фиксации субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.E. Alestin, C. Hoffmann, L.M. Firsov et.al. // J. Mol. Biol. 1994. V.238. P.575 - 591.
2. Vamashita I., Suzuki K., Fukui S. // J. Bacteriol. 1985. V. 161. № 2. P. 567 - 573.
3. А.Н. Яковлев, Н.А. Жеребцов, В.С. Григоров и др. // Биотехнол. 1994. № 3. С. 11 - 14.
4. Детерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир. 1970. 252 с.
5. Рыжакова В.Г., Фениксова Р.Ф. // Прикл. биохим. и микробиол. 1967. Т. 4. вып. 1. - С. 5 - 12.
6. Thannhauser T.W., Konishi Y., Scherada H.A. // Anal. Biolchem. 1984. V. 138. № 1. P. 181 - 188.
7. S. Hayachida, K. Nakamura, W. Kanlayakrit et.al. // Agr. Biol. Chem. 1989. V. 53. P. 143 - 149.
8. Kraulis I. // J. Appl. Grystallogr. 1991. V. 24. P. 946 - 950.
9. Савельев А.Н., Сергеев В.Р., Фирсов Л.М. // Биохимия. 1989. Т. 54. вып. 10. С. 1725 - 1731.
10. B.Stoffer, T.P. Frandsen, P.K. Busk et.al. // Biochem. J. 1993. V. 292. P. 197 - 202.
11. Williamson G., Belshaw N.J., Williamson M.P. // Biochem. J. 1992. V. 282. part. 2 P. 423 - 428.