

И. А. ВАЙНТРАУБ, А. Д. ШУТОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИССОЦИАЦИИ 7S-БЕЛКОВ СЕМЯН ВИКИ И СОИ В МОЧЕВИНЕ И ГУАНИДИНХЛОРИДЕ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 VI 1971)

Относительно хорошо изучена четвертичная структура 11S-белков семян вики и сои (¹⁻³). Другой запасной белок этих семян, 7S-белок, исследован значительно меньше. Медленно седиментирующие компоненты были обнаружены в растворах 7S-белка вики (вицилина) в кислой среде (⁴) и 7S-белка сои в кислой среде и в присутствии детергентов (^{5, 6}). Во всех этих случаях диссоциация была лишь частичной. Полное исчезновение исходной формы 7S-белка сои было достигнуто в растворах мочевины при концентрации последней ≥ 4 мол/л (⁵). Сходные результаты были получены и при исследовании 7S-белков арахиса (⁷) и гороха (⁸). Ни в одной

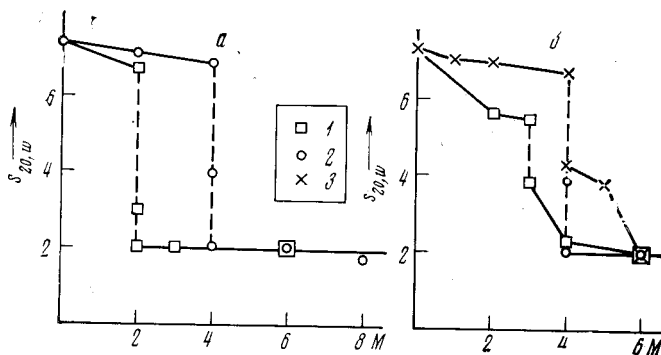


Рис. 1. Зависимость коэффициентов седиментации 7S-белков семян вики (а) и сои (б) от концентрации мочевины и гуанидинхлорида. 1 — растворы в гуанидинхлориде; 2 — растворы в мочевины; 3 — данные Робертса и Бриггса (⁵)

из перечисленных работ диссоциация 7S-белков не была подтверждена определением молекулярного веса медленно седиментирующих компонентов.

В настоящей работе мы исследовали диссоциацию 7S-белков семян вики и сои в растворах мочевины и гуанидинхлорида и определили молекулярные веса образующихся субъединиц. Полученные результаты позволили доказать наличие субъединиц у исследованных белков, установить двухступенчатый характер их диссоциации и определить число субъединиц в молекуле 7S-белков.

Препарат 7S-белка вики, выделенный методом зонного изоэлектрического осаждения (⁹), содержал по данным ультрацентрифугирования небольшую примесь 11S-белка (около 5%). Для выделения 7S-белка сои из водного экстракта при pH 5,4 осаждали нерастворимую на холоду фракцию, а оставшийся в растворе белок хроматографировали на гидроксил-апатите (¹⁰). Полученный препарат содержал около 8% низкомолекулярной примеси, которая была удалена хроматографией на сефадаксе Г-75. Очищенный таким образом 7S-белок полностью димеризовался при $\mu =$

$\mu = 0,1$ и содержал 4,7% углеводов (в расчете на глюкозу, определено фенольным методом ⁽¹¹⁾), что хорошо согласуется с литературными данными ⁽¹²⁾.

Коэффициенты седиментации определяли в ультрацентрифуге MOM, модель G-120, при 20°. Концентрация белка составляла 0,4–0,5%. Все растворы содержали 0,01 M 2-меркаптоэтанол, а растворы мочевины — еще и трис-HCl-буфер pH 7,4, $\mu = 0,1$. Значения плотности и вязкости, необходимые для вычисления $s_{20,w}$, определяли экспериментально, а удельный парциальный объем 7S-белка вики принимали равным 0,730 см³/г (вычислено по данным аминокислотного состава ⁽¹³⁾) и 7S-белка сои 0,725 см³/г ⁽¹⁴⁾.

Как видно из рис. 1а, 7S-белок вики при концентрациях мочевины > 4 мол/л полностью переходит в медленно седиментирующий 2S-компонент. В 4 M мочеvine процесс диссоциации протекает замедленно. Через

4 часа после растворения диссоциировано 63% 7S-белка, а через 31 час 87%. Одновременно $s_{20,w}$ медленного компонента снижается с 3,98 до 2,17S и становится практически

таким же, как и $s_{20,w}$, наблюдаемый при более высоких концентрациях мочевины. Аналогичные процессы происходят и в растворах гуанидинхлорида, с той лишь разницей, что медленная диссоциация наблюдается при более низкой концентрации гуанидинхлорида (рис. 1а).

Полученные результаты показывают, что диссоциация 7S-белка вики на 2S-субъединицы происходит через промежуточный 4S-компонент. Последний, очевидно, весьма неустойчив, обнаруживается только на начальных стадиях диссоциации и переходит в 2S-компонент еще до того, как диссоциирует весь 7S-белок. Более низкое значение $s_{20,w}$ промежуточного компонента в гуанидинхлориде обусловлено, по-видимому, тем, что определялся $s_{20,w}$ неразделившейся смеси 4S- и 2S-компонентов.

При исследовании поведения 7S-белка семян сои в мочеvine Робертс и Бриггс не обнаружили промежуточный 4S-компонент ⁽⁵⁾. Однако, если привести полученные ими значения s к плотности и вязкости воды (рис. 1б), становится очевидным, что и в случае 7S-белка сои 4S-компонент образуется в 4 M (через 7 дней после растворения) и в 5 M мочеvine (через 5 час. после растворения). По нашим данным, в 4 M мочеvine уже через 3 часа обнаруживается только 4S-компонент, который затем очень медленно переходит в 2S-компонент (рис. 1б и 2). Меньшая степень диссоциации 7S-белка у Робертса и Бриггса обусловлена, очевидно, тем, что эти авторы применяли растворы с $\mu = 0,5$, а более высокая ионная сила препятствует диссоциации 7S-белков ^(6, 7).

Диссоциация 7S-белка сои до 2S-компонента и наличие промежуточного 4S-компонента наблюдается также в растворах гуанидинхлорида (рис. 1б). При этом в 2 и 3 M растворах происходит существенное снижение $s_{20,w}$ 7S-белка, указывающее, по-видимому, на значительные конформационные изменения, предшествующие его диссоциации.

Таким образом, диссоциация 7S-белков вики и сои протекает аналогично. Однако 7S-белок сои отличается большей устойчивостью промежу-

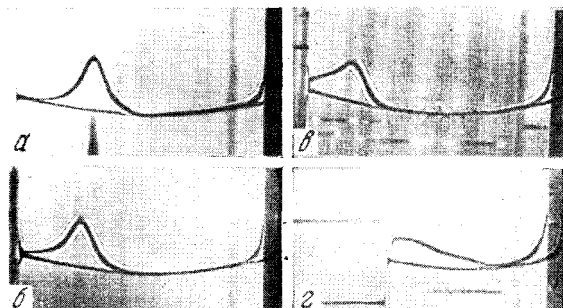


Рис. 2. Седиментационные диаграммы 7S-белка семян сои в 4 M мочеvine: а — через 3 часа, б — через 26 час., в — через 132 часа и г — через 358 час. после растворения. Направление седиментации слева направо, двусекторная ячейка, 50 000 об/мин, температура 20°, угол наклона фазовой пластинки 16°, время после достижения полной скорости (в мин.): а — 122, б — 102, в — 84, г — 115

Молекулярный вес субъединиц 7S-белков

2S-субъединицы (вика)			2S-субъединицы (сой)			4S-субъединицы (сой)		
скорость центри- фугир., об/мин.	C ₀ , %	мол. вес	скорость центри- фугир., об/мин.	C ₀ , %	мол. вес	скорость центри- фугир., об/мин.	C ₀ , %	мол. вес
18750	0,21	32300	15800	0,31	33200	11550	0,30	86000
15790	0,37	35000	15800	0,24	29600	10000	0,31	82300
15800	0,31	32700	15800	0,31	30900	11540	0,26	83100
Среднее		33300			31200			83800

точного 4S-компонента, что позволяет получить последний в относительно чистом виде.

Для определения молекулярных весов исследовали растворы 7S-белков в 6 *M* мочеvine (2S-субъединицы) и в 4 *M* мочеvine в течение первых суток после растворения (4S-компонент). Применяли метод седиментационного равновесия, расчеты проводили по Ламму ⁽¹⁵⁾. Подробнее примененная методика описана ранее ⁽¹⁾.

Кривые зависимости $\lg \left(\frac{1}{r} \cdot \frac{dc}{dr} \right)$ от r^2 при седиментационном равновесии значительно отклонялись от прямолинейности в донной части ячейки, что, очевидно, обусловлено агрегацией субъединиц. Аналогичное явление наблюдалось также при исследовании субъединиц 11S белков ^(1, 3). Увеличение концентрации меркаптоэтанола до 0,15 мол/л мало влияло на характер кривых. Молекулярные веса, рассчитанные по прямолинейным участкам, приведены в табл. 1.

Хотя 2S-субъединицы 7S-белков, по-видимому, неидентичны ^(8, 14, 16), симметричность полученных нами седиментационных кривых свидетельствует о близости неидентичных субъединиц по форме и размерам. Это позволяет по полученным, очевидно средним, значениям молекулярного веса рассчитать число субъединиц. Учитывая, что молекулярный вес недиссоциированного 7S-белка вики равен 186 000—193 000 ⁽⁴⁾, а сои — 180 000—193 000 ⁽¹⁴⁾, полученные нами результаты однозначно показывают, что молекулы исследованных 7S-белков состоят из 6 2S-субъединиц и претерпевают двухступенчатую диссоциацию. 4S-Субъединицы 7S-белка сои, вероятнее всего, являются полумолекулами, а полученное нами значение их молекулярного веса несколько занижено вследствие образования примеси 2S-субъединиц во время установления седиментационного равновесия (рис. 2б). Молекулярный вес 4S-субъединиц 7S-белка вики не мог быть определен вследствие их неустойчивости, однако сходство характера диссоциации обоих исследованных белков позволяет предположить, что и диссоциация 7S-белка вики проходит через стадию полумолекул. Таким образом, диссоциация исследованных 7S-белков в мочеvine и гуанидинхлориде протекает, очевидно, по схеме: $7S \rightarrow 2 \cdot 4S \rightarrow 6 \cdot 2S$.

Обращает на себя внимание сходство четвертичной структуры 7S- и 11S-белков. Полумолекулы 11S-белков, близкие к 7S-белкам по своему молекулярному весу, также диссоциируют на 6 2S-субъединиц и также образуют промежуточные субъединицы, которые, однако, в отличие от 7S-белков состоят не из трех, а из двух 2S-субъединиц.

Сходство 7S- и 11S-белков не ограничивается их четвертичной структурой. Если сопоставить их аминокислотный состав ⁽¹³⁾, применив недавно предложенный количественный критерий «разностный индекс» ⁽¹⁷⁾, то для пар 7S — 11S-белок вики и сои получим 11,4 и 11,5 соответственно. Такие низкие величины «разностных индексов» свидетельствуют о значи-

тельной близости аминокислотного состава этих белков (¹⁷). Сходство 11S- и 7S-белков по четвертичной структуре и аминокислотному составу может указывать на их гомологичность.

Выражаем искреннюю благодарность В. Г. Клименко за внимание и интерес к настоящей работе.

Кишиневский государственный университет
им. В. И. Ленина

Поступило
16 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. А. Вайнтрауб, Нгуен тхань Туен, Мол. биол., 5, 59 (1971).
² К. Okubo et al., Agric. and Biol. Chem., 33, 463 (1969). ³ И. А. Вайнтрауб, А. Д. Шутов, Биохимия, 36, в. 5, 1086 (1971). ⁴ А. Д. Шутов, И. А. Вайнтрауб, Биохимия, 31, 726 (1966). ⁵ R. C. Roberts, D. R. Briggs, Cereal Chem., 42, 71 (1965). ⁶ I. Koshiyama, Agric. and Biol. Chem., 32, 879 (1968). ⁷ W. E. F. Naismith, R. K. Williams, J. Polymer Sci., 26, 199 (1957). ⁸ D. R. Grant, J. M. Lawrence, Arch. Biochem. and Biophys., 108, 522 (1964). ⁹ А. Д. Шутов, И. А. Вайнтрауб, Укр. биохім. журн., 37, 177 (1965). ¹⁰ W. J. Wolf, D. A. Sly, Cereal Chem., 44, 653 (1967). ¹¹ M. Dubois et al., Anal. Chem., 28, 350 (1956). ¹² I. Koshiyama, Agric. and Biol. Chem., 30, 646 (1966). ¹³ И. А. Вайнтрауб, В. С. Шварц, Тр. по химии природн. соед., Кишинев, 8, 51 (1969). ¹⁴ I. Koshiyama, Cereal Chem., 45, 394 (1968). ¹⁵ O. Lamm, Zs. phys. Chem., A143, 177 (1929). ¹⁶ P. Jackson et al., New Phytologist, 68, 25 (1969). ¹⁷ H. Metzger et al., Nature, 219, 1166 (1968).