

О. А. ХАРЧУК, И. И. ГАРЯЕВ, В. И. ПУСТОВОИТ, Б. Ф. ПОГЛАЗОВ
ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ВИРУСА ОГУРЕЧНОЙ
МОЗАИКИ-3,4 МЕТОДОМ ДИСПЕРСИИ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 13 XII 1972)

В нашей предыдущей работе (¹) было показано, что нативный белок ВТМ в водном растворе дает спектр оптической активности, характерный, как правило, для белков в органических растворителях. Белок, максимально денатурированный щелочью (в пределах выбранных условий опытов), дает спектр оптической активности, характерный для водных растворов белков. Спектры оптической активности белка ВТМ промежуточных степеней денатурации соответствуют мнимому переходу от органических растворителей к водным, хотя опыты проводились с водным раствором белка.

Подобно Харрисону и Блауту (²), изучавшим структуру апомноглобина, мы интерпретировали данный факт влиянием локального окружения пептидных связей α -спирали в белке ВТМ. Если все α -спиральные участки (или их большая часть) локализованы внутри глобулы, то они находятся в окружении, подобном органическому растворителю. При добавлении щелочи происходит разрыхление белковой глобулы, молекулы воды совместно с ионами щелочи получают более свободный доступ к пептидным связям α -спирали, окружение пептидных связей становится менее гидрофобным, они приходят в контакт с водным раствором и таким образом повышается локальная диэлектрическая постоянная окружения пептидных связей в макромолекуле.

Объектом данной работы выбран структурный белок вируса огуречной мозаики-3,4 (ВОМ_{3,4}). ВОМ_{3,4} относится к группе палочковидных вирусов растений. Сведения о структуре ВОМ_{3,4} были получены в основном с помощью рентгеноструктурного анализа (³). Морфологически ВОМ_{3,4} почти неотличим от ВТМ. Белковая субъединица ВОМ_{3,4} построена на основе единой полипептидной цепи, состоящей из 158 аминокислотных остатков. Молекулярный вес белковой субъединицы равен 19,0—21,5 тыс. дальтон.

Анализ аминокислотного состава, проведенный Птицыным и Скворцовым (⁴), показывает, что как у белка ВТМ, так и у белка ВОМ_{3,4} количества полярных остатков недостаточно для заполнения всей поверхности белковой субъединицы, причем у белка ВОМ_{3,4} дефицит больше. В соответствии с моделью строения глобулярных белков Талмуда и Бреслера (⁵) авторы принимали, что белковые субъединицы имеют форму сфероида, состоящего из внутреннего неполярного ядра и внешнего полярного слоя толщиной 4 Å. В действительности дефицит еще больше, так как субъединица вытянута. В водном растворе это обуславливает гидрофобный эффект, который выражается в увеличении компактности третичной структуры белковых субъединиц и в их способности к спонтанной агрегации.

В препаратах белка ВОМ_{3,4} обнаружена сильно выраженная тенденция к реполимеризации. Реполимеризация белка ВОМ_{3,4} с образованием палочковидных частиц, морфологически сходных с интактным вирусом, имеет место при более высоких значениях pH, чем в случае ВТМ. Реполимеризацию белка ВОМ_{3,4} можно обнаружить в диапазоне pH 6,5—8,5, в то время как белок ВТМ не способен реполимеризоваться при pH 7,5—7,7 (⁶).

Результаты опытов по тепловой и щелочной денатурации белка ВОМ_{3,4}

Состояние белка ВОМ _{3,4}	Условия опыта			A_{193}	A_{225}	Содержание α -спирали, %
	темпера- тура, °C	[KOH], M	время инкубации в данных условиях, мин.			
1	10—40	—	60	880	—750	40
2	50—75	—	60	410	—560	29
3	20	0,5	30	0	—300	17
4	20	2,0	30	—250	—200	11

Белок ВОМ_{3,4} характеризуется меньшим по сравнению с белком ВТМ содержанием ароматических аминокислот. Если 0,1% раствору белка ВТМ соответствует оптическая плотность 1,3 при 280 мμ, то раствору белка ВОМ_{3,4} такой же концентрации соответствует оптическая плотность 0,7. Это свойство белка ВОМ_{3,4} делает его очень удобным объектом для спектрополяризметрических исследований, так как интерпретация спектров оптической активности белков с высоким содержанием ароматических аминокислот может затрудняться вследствие дополнительных вкладов ориентированных в пространстве ароматических остатков.

Для получения белка ВОМ_{3,4} использовался метод деградации ВОМ_{3,4} 67% уксусной кислотой, предложенный в (7). Расчет концентрации белка производили, принимая, что $D_{280} = 0,7$ соответствует концентрации белка 1,0 мг/мл. Спектрофотометрирование проводили на спектрофотометре «Hitachi 124» с использованием односантиметровых кювет. Исходным препаратом (состояние 1) служил белок при 10°, растворенный в 0,001 M трис-HCl-буфере pH 8,6. Спектры оптической активности получали на спектрополяриметре «ORD-UV5-Jasco», применяя 1-сантиметровые кварцевые кюветы, в области $\lambda = 340-240$ мμ. Концентрация белка от 0,4 до 0,8 мг/мл.

Для анализа спектров оптической активности использовали уравнение, предложенное Шехтером и Блаутом (8) для количественной оценки содержания α -спирали в белках и синтетических полипептидах, являющихся смесью только α -спиральной и неупорядоченной конфигураций,

$$[R'] = A_{193} \frac{\lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + A_{225} \frac{\lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}. \quad (1)$$

Численные значения параметров A_{193} и A_{225} этого уравнения связаны линейными зависимостями с долей α -спирали в белке, а также между собой. Характер этих линейных зависимостей закономерно изменяется при различном выборе растворителя, даже когда есть уверенность, что полипептид имеет структуру только одного типа (9). При описании дисперсии оптического вращения белков и синтетических полипептидов в водных растворах ($E > 30$) уравнением (1) параметры A_{193} и A_{225} связаны зависимостью $A_{225} = -0,55A_{193} - 430$ (прямая I на рис. 2). Для белков и синтетических полипептидов в органических растворителях ($E < 30$) характерна зависимость $A_{225} = -0,55A_{193} - 280$ (прямая II на рис. 2).

При данной длине волны монохроматического света приведенное среднее вращение, приходящееся на элементарное звено полипептидной цепи в вакууме $[R']$, находили из соотношения $[R'] = [\alpha] / 1,39$ (10), где $[\alpha]$ — удельное вращение при данной длине волны $[\alpha] = \alpha^0 / C \cdot l$, α^0 — угол поворота плоскости поляризации света (град.), C — концентрация вещества в растворе (г/см³), l — длина пути пучка света в растворе (дм). Константы

A_{193} и A_{225} находили графически, преобразуя уравнение (1) к виду

$$[R'] \left(\frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda_{193}^2} \right) = A_{193} + A_{225} \cdot \frac{\lambda_{225}^2}{\lambda_{193}^2} \left(\frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2} \right).$$

A_{193} определяли как начальный отрезок, отсекаемый прямой зависимости

$$[R'] \left(\frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda_{193}^2} \right) \text{ от } \frac{\lambda_{225}^2}{\lambda_{193}^2} \left(\frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2} \right).$$

Константа A_{225} есть тангенс угла наклона этой прямой. По величине параметра $A_{193} - A_{225}$, который как предполагается, не зависит от растворителя⁽⁹⁾, вычисляли процентное содержание α -спирали в белке $\text{ВОМ}_{3,4}$

$$f = \frac{A_{193} - A_{225} + 650}{55,8}.$$

Расчеты по уравнению (1) проводили для длин волн от 260 до 340 м μ .

Различный выбор условий опыта позволил получить спектры оптической активности белка $\text{ВОМ}_{3,4}$ в различных по степени денатурации состояниях — от нативной структуры до сильно денатурированной.

Для каждого исследованного состояния из спектров оптической активности нами вычислены параметры A_{193} и A_{225} . Каждому денатурирующему воздействию соответствует определенное состояние белка $\text{ВОМ}_{3,4}$ (табл. 1), которое отмечено точкой на графике зависимости A_{225} от A_{193} (рис. 2).

Спектр нативного белка $\text{ВОМ}_{3,4}$ (рис. 1) не содержит эффект Коттона в области поглощения ароматических аминокислот. Нативный белок характеризуется параметрами уравнения (1) $A_{193} = 880$; $A_{225} = -750$. На графике зависимости A_{225} от A_{193} эта точка ложится на прямую для белков и синтетических полипептидов в органических растворителях, хотя изучаемый белок находился в воде.

Воздействие сравнительно больших концентраций щелочи не вело к полному разупорядочению структуры белка $\text{ВОМ}_{3,4}$ (состояния 3, 4). Для денатурированного белка точки зависимости A_{225} от A_{193} лежат между прямыми для водных и органических растворителей. Дальнейшее повышение концентрации щелочи от 2 до 5 мол. не вызывало изменения спектра оптической активности (рис. 1).

Рис. 2. Зависимость A_{225} от A_{193} для белка $\text{ВОМ}_{3,4}$ различной степени денатурации. I — водные растворы, II — органические растворители

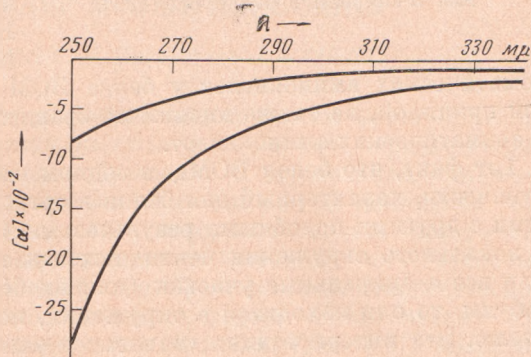
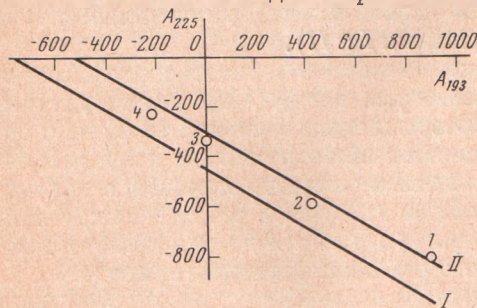


Рис. 1. Спектры оптической активности белка $\text{ВОМ}_{3,4}$. Исходный препарат (состояние 1) и белок в 2 М КОН (состояние 4)

Белок $\text{ВОМ}_{3,4}$ в интервале температур от 10 до 40° сохраняет оптическую активность, характерную для исходного состояния. При дальнейшем нагревании в интервале температур 40–50° наблюдается скачкообразное изменение спектра оптической активности, связанное с падением α -спиральности (рис. 3). Дальнейшее прогревание раствора белка до 75° не приводило к изменению оптической активности белка $\text{ВОМ}_{3,4}$ (состояние 2). Охлаждение раствора белка до 20° не восстанавливало исходного количества α -спирали.

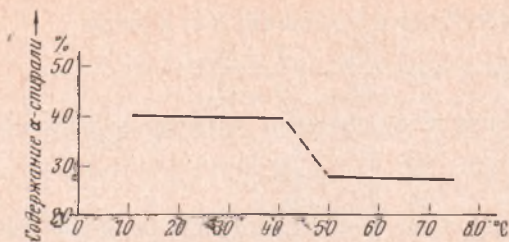


Рис. 3. Температурная зависимость содержания α -спирали в белке BOM_{3,4}

ароматических аминокислот у белка BOM_{3,4} можно объяснить не только этой причиной, но также низким по сравнению с белком ВТМ содержанием ароматических аминокислот.

Тот факт, что белок BOM_{3,4} в водном растворе дает спектр оптической активности, характерный для белка в органическом растворителе, по аналогии с другими подобными результатами (¹, ²) можно объяснить влиянием локального окружения пептидных связей α -спирали в белке BOM_{3,4}. Если все α -спиральные участки (или их большая часть), укрыты внутри глобулы, то они находятся в окружении, подобном органическому растворителю. Эта интерпретация становится еще более вероятной, если учесть данные анализа аминокислотного состава белков ВТМ и BOM_{3,4} (⁴), где показано, что полярных остатков в этих белках недостаточно даже для того, чтобы покрыть поверхность белковых глобул.

Уменьшение α -спиральности при щелочной денатурации (состояние 3) связано, по-видимому, с разрушением внешних участков α -спирали. Ядро белковой субъединицы остается хорошо изолированным от внешней среды, о чем говорит сходство оптической активности частично денатурированного белка BOM_{3,4} и белков в органических растворителях.

В более жестких условиях (состояние 4) ядро макромолекулы частично разрушается, но остаток α -спирали остается не полностью доступным молекулам воды, что равносильно окружению пептидных связей со средней эффективной диэлектрической постоянной, промежуточной между диэлектрическими постоянными для воды и органических растворителей (на рис. 2 точка 4 располагается между прямыми I и II).

На изоляцию α -спиральных участков белка BOM_{3,4} указывают также высокие концентрации щелочи, необходимые для разрушения его структуры.

Увеличение температуры ведет к разрыхлению белковой глобулы с одновременным уменьшением доли α -спирали. Молекулы воды получают более свободный доступ к пептидным связям α -спирали, окружение пептидных связей становится менее гидрофобным (на рис. 2 точка 2 между прямыми I и II). Узкий температурный интервал перехода из одного состояния в другое (рис. 3) свидетельствует о его кооперативной природе.

Московский государственный университет

им. М. В. Ломоносова

Институт космических исследований

Академии наук СССР

Москва

Поступило

2 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 П. П. Гаряев, О. А. Харчук, Б. Ф. Поглазов, Биохимия, 37, 1210 (1972).
- 2 S. C. Harrison, E. R. Blout, J. Biol. Chem., 240, 299 (1965).
- 3 R. E. Franclin, Biochim. et biophys. acta, 19, 203 (1956).
- 4 О. Б. Птицын, А. М. Скворцов, Биофизика, 11, 3 (1966).
- 5 С. Е. Бреслер, Д. Л. Талмуд, ДАН, 43, 326, 367 (1944).
- 6 Н. А. Киселев, И. Г. Атабеков и др., Биохимия, 31, 670 (1966).
- 7 H. Fraenkel-Conrat, Virology, 4, 1 (1957).
- 8 E. Schechter, E. Blout, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 695 (1964).
- 9 Е. Блаут, Дж. Карвер, Е. Шехтер, В кн. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии, 1970.
- 10 П. Доти, В сборн. Современные проблемы биофизики, 1, 1961, стр. 138.
- 11 N. S. Simmons, E. R. Blout, Biophys. J., 1, 55 (1960).