

УДК 548.737:547.963.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Б. К. ВАЙНШТЕЙН, Э. Г. АРУТЮНЯН,  
И. П. КУРАНОВА, В. В. БОРИСОВ, Н. И. СОСФЕНОВ, А. Г. ПАВЛОВСКИЙ,  
А. И. ГРЕБЕНКО, Н. В. КОНАРЕВА

## РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЛЕГГЕМОГЛОБИНА *LUPINUS LUTEUS* L. С РАЗРЕШЕНИЕМ 5 Å

Леггемоглобины образуются в клубеньках бобовых растений и являются растительными аналогами большого семейства животных многоглобинов и гемоглобинов — гемсодержащих белков, способных к обратимому присоединению молекулярного кислорода. Функция леггемоглобинов сводится к участию в системе фиксации атмосферного азота бактериями *Rhizobium*, живущими в симбиозе с бобовыми растениями (<sup>1</sup>).

До настоящего времени была известна пространственная структура ряда многоглобинов и гемоглобинов животного происхождения (<sup>2</sup>). В данной работе мы сообщаем о расшифровке пространственной структуры растительного гемоглобина — леггемоглобина из клубеньков желтого люпина, *Lupinus luteus* L., с разрешением 5 Å.

Леггемоглобин люпина является мономерным белком, с молекулярным весом около 16 000 (<sup>3</sup>). Последовательность аминокислотных остатков для него пока полностью не определена, но известна последовательность леггемоглобина сои (<sup>4</sup>), который, по-видимому, близок к изучаемому нами белку.

Гомогенный препарат леггемоглобина из экстрактов клубеньков люпина получали хроматографией последовательно на  $Al_2O_3$  и на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 7,0; белок элюировали аммоний-ацетатным буфером. Для выращивания кристаллов использовали фракцию, элюируемую 0,04 М буфером, после рехроматографии. Ее однородность контролировали путем диск-электрофореза.

Коричнево-красные кристаллы, удлиненные вдоль оси 2-го порядка, появлялись из 1,7% белкового раствора, pH 7,0, пересыщенного добавлением сульфата аммония. Через 3—5 недель кристаллы достигали размера  $0,5 \times 0,6 \times 1$  мм<sup>3</sup> (рис. 1).

Как сообщалось ранее (<sup>5</sup>), кристаллы относятся к моноклинной сингонии, пространственная группа  $C_2^2$  в установке B2,  $a=92,95$ ;  $b=38,31$ ;  $c=52,15$  Å,  $\gamma=98^\circ 45'$ . В элементарной ячейке содержится 4 молекулы белка, т. е. на независимую часть приходится одна молекула.

Рентгенографическое определение структуры выполнено с помощью основного метода белковой кристаллографии, связанного с получением изоморфных кристаллов производных белка, содержащих тяжелые атомы. Необходимые производные были получены настаиванием кристаллов чистого леггемоглобина в растворах, содержащих тяжелоатомные соединения. Вхождение последних в кристаллы регистрировали по изменению интенсивностей дифракционных отражений на прецессионных рентгенограммах. Были отобраны производные со следующими соединениями:  $UO_2(NO_3)_2$ ,

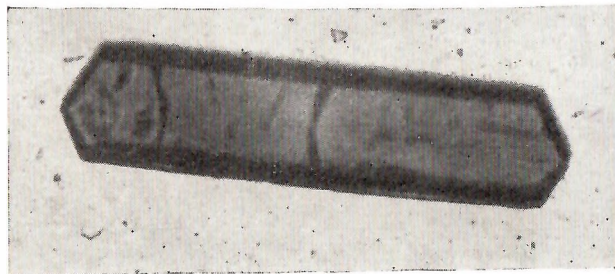


Рис. 1

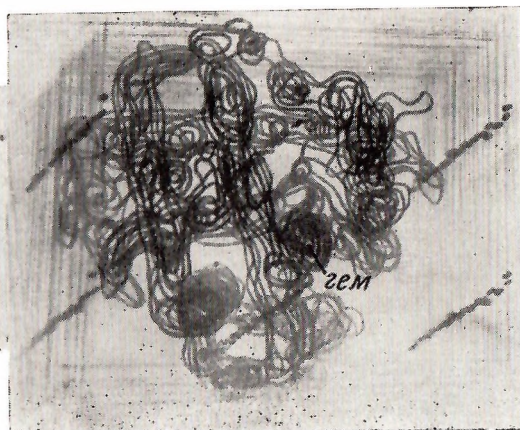


Рис. 2

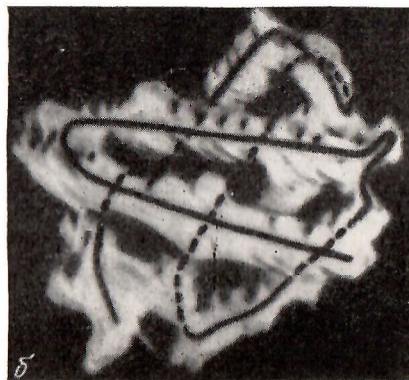
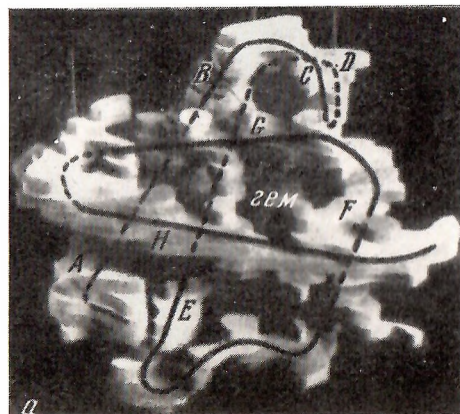


Рис. 3

Рис. 1. Кристалл леггемоглобина (50×)

Рис. 2. Трехмерный синтез Фурье леггемоглобина

Рис. 3. Модель молекулы леггемоглобина (а), и гемоглобина *Glucera dibranchiata* (б). Обе модели соответствуют разрешению 5 Å. Темными линиями указан ход полипептидной цепи. На модели леггемоглобина буквами обозначены спиральные сегменты



$K_2HgJ_4$ ,  $J_2$  и 3-хлормеркурпиридин. Трехмерные наборы интенсивностей дифракционных отражений от кристаллов белка и четырех указанных выше производных (830 независимых отражений для каждого кристалла) были измерены на 3-кружном полуавтоматическом дифрактометре «Nonius» с использованием  $CuK\alpha$ -излучения.

Места присоединения и коэффициенты заполнения тяжелых атомов в производных с ионами  $UO_2^{2+}$  и  $HgJ_4^{2-}$  были определены по трехмерным разностным синтезам Паттерсона. Расшифровка двух других производных была проведена по разностным синтезам Фурье, с использованием в качестве коэффициентов

$$m(|F_{BT}| - |F_B|) \exp(i\varphi),$$

где  $F_B$  и  $F_{BT}$  — структурные факторы белка и производного,  $\varphi$  — приближенная фаза  $F_B$ , а  $m$  — показатель достоверности ее определения, согласно (6).

Уточнение параметров тяжелых атомов проводилось по алгоритму программы Мьюрхед (7), реализованному в кодах машины М-220 и связанному в единый программный комплекс со стандартным комплексом для определения кристаллических структур «Рентген-68», созданным в отделении Института химической физики АН СССР (Черноголовка) под руководством Б. Л. Тарнопольского.

Все расчеты производились на ЭВМ М-220 М в вычислительном центре Института кристаллографии АН СССР.

Синтез электронной плотности  $\rho(xyz)$  был построен с использованием «наилучших» фаз (6), при среднем значении  $m$  0,85. Синтез был построен с шагом  $1/60$ ,  $1/30$  и  $1/40$  по осям  $x$ ,  $y$ ,  $z$  соответственно (без учета  $F_{000}$ ) и представлен в виде набора  $xy$ -сечений с изолиниями, соответствующими трем относительно высоким уровням электронной плотности. На рис. 2 представлен этот синтез, причем нанесены контуры, относящиеся только к одной молекуле белка. Вырезанные по внешнему контуру плоские «срезы» областей повышенной электронной плотности при их наложении друг на друга дают картины пространственного строения молекулы (рис. 3а).

Построенная таким образом модель молекулы леггемоглобина дает очевидное и однозначное следование полипептидной цепи белка, а также указывает расположение и ориентацию гемогруппы. При этом обнаруживается поразительно близкое сходство с пространственной структурой миоглобинов и гемоглобинов ранее исследованных видов (рис. 3б): мы видим тот же «миоглобиновый» тип свертывания цепи, впервые установленный Кендрию с сотрудниками (8, 9) при исследовании структуры миоглобина кашалота. Это сразу выявившееся сходство облегчало интерпретацию синтеза, однако она была бы столь же однозначной, если опираться только на прямолинейный ход  $\alpha$ -спиралей и неразветвленность полипептидной цепи.

На синтезе электронной плотности леггемоглобина хорошо видны все 8  $\alpha$ -спиральных сегментов молекулы, обычно присутствующие в миоглобинах и гемоглобинах, а также короткие нерегулярные участки полипептидной цепи между ними. При сравнении молекулы леггемоглобина с другими гомологами мы будем пользоваться номенклатурой Кендрию (10), в которой последовательные  $\alpha$ -спиральные сегменты обозначаются буквами от А до Н, а соединяющие их нерегулярные участки цепи — двухбуквенными символами: АВ, ВС и т. д.

Принимая проекцию каждого остатка на ось спирали равной  $1,5 \text{ \AA}$  (11), можно оценить примерное число остатков в каждом из  $\alpha$ -спиральных сегментов. Основная неточность в этом случае связана с определением границ таких сегментов; она в особенности сказывается при анализе коротких, например, С- и D-спиралей. В табл. 1 приведено число остатков в  $\alpha$ -спиральных сегментах и углы между ними, взятые в сравнении с данными по другим гомологам. По числу остатков в А, В, Е- и G-спиралях леггемоглобин соответствует миоглобину кашалота (12), F-спираль оказывается длиннее,

а Н-спираль несколько короче. В этом отношении леггемоглобин ближе к гемоглобину червя *Glycera dibranchiata* (<sup>2</sup>, <sup>13</sup>).

Гемогруппа на синтезе выглядит как уплощенный эллипсоид, превышающий по уровню электронной плотности все другие участки синтеза (на рис. 2 — это сплошной темный диск). Как и в других белках этого типа, гем расположен между F- и E-спиралями и прикрыт с третьей стороны CD-областью. Плоскость гема примерно перпендикулярна линии, соединяющей ближайшие к нему точки на F- и E-спиралях.

Гомология структуры растительного белка — леггемоглобина — с гемоглобинами животного происхождения весьма примечательна в эволюционном отношении. Если считать сам факт гомологии связанным с существованием общих предков, то в роли таких предков оказываются организмы, существовавшие 1,3 млрд. лет назад, когда растения отделились от животного мира. Это наибольший срок зафиксированного рентгенографически сохранения пространственной структуры белков. Интересно отметить и то, что консерватизм третичной (пространственной) структуры в данном слу-

Таблица 1

Число аминокислотных остатков в  $\alpha$ -спиральных сегментах и углы между ними в леггемоглобине и его гомологах

	Леггемоглобин	Гемоглобин лошади ( $\alpha$ -цепь)	Гемоглобин лошади ( $\beta$ -цепь)	Миоглобин канальота	Гемоглобин червя <i>Glycera</i>
Число аминокислотных остатков					
A	16	16	16	16	16
B	16	16	16	16	16
E	20	20	20	20	19
F	14	9	9	9	12
G	19	19	19	19	18
H	23	21	21	26	22
Углы между спиралями (в градусах)					
AB	107	94	90	102	96
BE	87	117	117	103	122
EF	124		151		138
FG	109		113		114
GH	147	156	158	162	150
EG	97	97	89	92	83
BG	133	127	125	127	128
BH	77	67	68	67	77

чае (в отличие, скажем, от цитохромов) проявился при крайне слабом сохранении первичной структуры: число инвариантных остатков во всех до сих пор исследованных гемоглобинах составляет всего лишь три на 140—150 остатков. При этом гемоглобины оказались связанными с совершенно разными физиологическими системами: к системам транспорта кислорода в токе артериальной крови и запасаения кислорода в мышцах добавляется система, связанная с фиксацией атмосферного азота. Это привлекает интерес к более подробному изучению связи структуры леггемоглобина с его функцией, которое может быть проведено после исследования леггемоглобина при более высоком разрешении.

Авторы признательны академику Я. В. Пейве, привлечшему наше внимание к изучению леггемоглобина, а также Г. Я. Жизневской и Б. П. Атанасову (Болгария) — за помощь и ценные советы на некоторых стадиях работы.

Институт кристаллографии  
им. А. В. Шубникова  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
9 IV 1974

- <sup>1</sup> J. A. Cutting, H. M. Schulman, *Biochim. et biophys. acta*, v. 229, 58 (1971).
- <sup>2</sup> W. E. Love, P. A. Klock *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 36, 349 (1971).
- <sup>3</sup> Я. В. Пейсее, Б. П. Атанасос *и др.*, *ДАН*, т. 202, 482 (1972).
- <sup>4</sup> N. Ellfolk, G. Sievers, *Acta chem. scand.*, v. 25, 3532 (1971).
- <sup>5</sup> Э. Г. Арутюнян, В. Н. Зайцев *и др.*, *Кристаллография*, т. 16, 237 (1971).
- <sup>6</sup> D. M. Blow, F. H. C. Crick, *Acta crystallogr.*, v. 12, 794 (1959).
- <sup>7</sup> H. Muirhead, J. M. Cox *et al.*, *J. Mol. Biol.*, v. 28, 117 (1967).
- <sup>8</sup> J. C. Kendrew, G. Bodo *et al.*, v. 181, 662 (1958).
- <sup>9</sup> J. C. Kendrew, R. E. Dickerson *et al.*, *Nature*, v. 185, 422 (1960).
- <sup>10</sup> J. C. Kendrew, H. C. Watson *et al.*, *Nature*, v. 190, 666 (1961).
- <sup>11</sup> L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 37, 205 (1951).
- <sup>12</sup> H. C. Watson, *Progr. Stereochem.*, v. 4, 299 (1969).
- <sup>13</sup> E. A. Padlan, W. E. Love, *Nature*, v. 220, 376 (1968).