

В. К. АНТОНОВ, Т. И. ВОРОТЫНЦЕВА, С. Л. АЛЕКСАНДРОВ,
Н. А. ГАВРИЛОВА, Е. Л. АРСЕНЬЕВА

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ И АССОЦИАЦИЯ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛЕЙЦИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
ИЗ *ESCHERICHIA COLI***

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 23 I 1975)

Неспецифический лейцинсвязывающий белок (ЛИВ-белок) является, по-видимому (см. (1)), компонентом транспортной системы алифатических аминокислот с разветвленной боковой цепью у *E. coli*. ЛИВ-белок был выделен несколькими группами исследователей (2-4) и, на основании довольно ограниченного числа экспериментов, был сделан вывод (2, 3, 5), что он имеет один связывающий субстрат центр на молекулу (молекулярный вес 35000) и не проявляет каких-либо аномалий при связывании лейцина. Однако разные авторы приводят различные значения константы диссоциации комплекса ЛИВ-белка с лейцином. Так, Пенрозе и сотр. (2) дают значение $K_D = 0,2-0,4$ мкМ, а согласно Айраку (3) эта величина равна 2,0-2,2 мкМ. Босс и сотр. (6) обнаружили, в случае сходного периплазматического белка, связывающего галактозу, индуцируемые субстратом конформационные изменения, приводящие к изменению константы связывания в зависимости от взятого интервала концентраций субстрата. Все это побудило нас исследовать связывание лейцина ЛИВ-белком в широком диапазоне концентраций как субстрата, так и самого белка.

Использованный нами метод очистки ЛИВ-белка и критерии его гомогенности приведены в работе (4). Белок дополнительно хроматографировали на био-геле Р-4 (100-200 меш) для удаления следов прочно связанных амфолитов. Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Связывающую активность измеряли методом равновесного диализа, как это описано в работе (3), с использованием равномерно меченого ^{14}C -L-лейцина (225 мС/ммоль).

Таблица 1

Связывание лейцина ЛИВ-белком

Концентрация белка, мкМ	Равновесные концентрации ^{14}C -L-лейцина, мкМ	Число точек	K_D (каж), мкМ	Кажущееся число связывающих центров, n (каж)
0,32	0,069—0,80	12	$0,35 \pm 0,15$	1,02
	0,75—28,6	19	$2,63 \pm 0,25$	(5—6)
1,28	0,075—2,54	9	$0,45 \pm 0,1$	0,825
3,20	0,070—2,50	11	$0,56 \pm 0,08$	0,780
6,40	0,072—1,0	15	$0,344 \pm 0,08$	0,625
	1,0—28,2	20	$3,45 \pm 0,52$	1,16
14,50	0,33—2,78	7	$1,67 \pm 0,35$	0,580
19,20	0,095—0,58	15	$0,54 \pm 0,04$	0,306
27,80	0,65—10,0	10	$1,05 \pm 0,12$	0,342
32,40	0,50—7,54	10	$1,49 \pm 0,20$	0,250
44,80	0,046—0,877	16	$1,54 \pm 0,15$	0,370
	1,30—31,5	10	$1,30 \pm 0,12$	0,348

Связывание субстрата ЛИВ-белком изучено нами в диапазоне концентраций белка ($[E]_0$) от 0,32 мкМ до 44,8 мкМ (в расчете на мол. вес 35000) и при концентрациях субстрата ($[S]_p$), значительно перекрывающих возможный интервал констант диссоциации комплекса (0,2–2 мкМ). На рис. 1 приведены графики Скатчарда для трех наиболее полно исследованных нами концентраций белка, а в табл. 1 суммированы значения

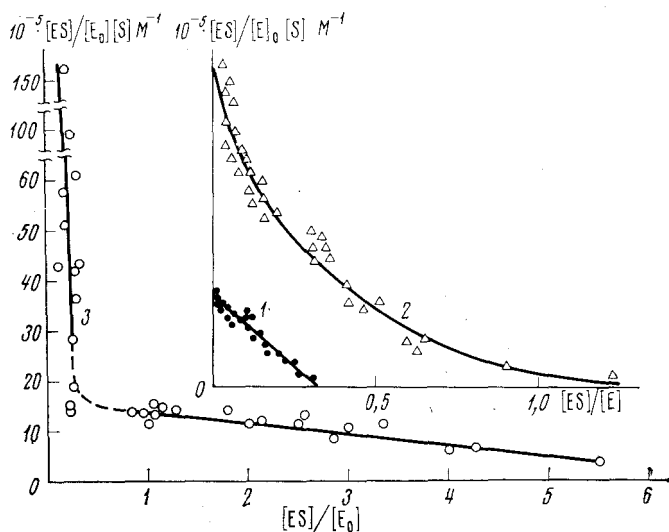


Рис. 1. Графики Скатчарда для связывания ^{14}C -L-лейцина ЛИВ-белком. 1 — $[E]_0 = 44,8$ мкМ, 2 — $[E]_0 = 6,4$ мкМ, 3 — $[E]_0 = 0,32$ мкМ. Масштаб ординаты для кривых 1 и 2 $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$

$K_{D(\text{каж})}$ и кажущегося числа связывающих субстрат центров, $n_{(\text{каж})}$, для всех использованных концентраций ЛИВ-белка. Графики Скатчарда значительно различаются для разных концентраций белка, причем при понижении ее все более четко проявляется нелинейность этих графиков. Величина $n_{(\text{каж})}$ закономерно уменьшается при повышении концентрации белка. При относительно низких значениях $[E]_0$ концентрация субстрата заметно влияет на величину $n_{(\text{каж})}$, но при высоких $[E]_0$, в использованном интервале $[S]_p$, кажущееся число связывающих субстрат центров не изменяется. Максимальное значение $n_{(\text{каж})}$, достигнутое в этих опытах, близко шести, однако, в условиях больших концентраций субстрата и малых значений $[E]_0$ ошибка в определении $n_{(\text{каж})}$ весьма велика и точно определить максимальное число связывающих центров этим методом невозможно. Следует отметить, что во всем изученном диапазоне концентраций связывание остается специфическим. Это было показано контрольными экспериментами с ^{14}C -L-фенилаланином.

Обработка полученных данных для значений $[E]_0$ 0,32 и 6,4 мкМ по методу двойных обратных величин выявила наличие двух участков прямой зависимости обратной величины концентрации комплекса от обратной равновесной концентрации субстрата. Экстраполяция прямых для области высоких концентраций субстрата ($[S]_p$ 0,7–30 мкМ) на ось абсцисс дает значение $K_{D(\text{каж})}$ 2,5–4,0 мкМ, тогда как экстраполяция прямых для низких концентраций субстрата дает величину $K_{D(\text{каж})} \sim 0,2$ –0,4 мкМ. Для высокой концентрации белка (44,8 мкМ) найденное значение $K_{D(\text{каж})}$ (1,2–1,7 мкМ) практически не зависит от интервала концентраций субстрата. Наконец, для промежуточных значений $[E]_0$ можно заметить тенденцию увеличения $K_{D(\text{каж})}$ при увеличении концентрации белка.

Такое поведение ЛИВ-белка может быть обусловлено его ассоциацией, проявляющейся особенно сильно при высоких его концентрациях, причем

ассоциация маскирует часть связывающих центров. Субстрат может влиять на степень ассоциации и демаскировать эти центры.

Чтобы проверить это предположение, мы изучили поведение ЛИВ-белка при хроматографии на сефадексе G-100. Белок хроматографировали на микроколонке объемом 0,5 мл, используя метод фронтальной элюции водой. Оказалось, что белок выходит с колонки несколькими фракциями

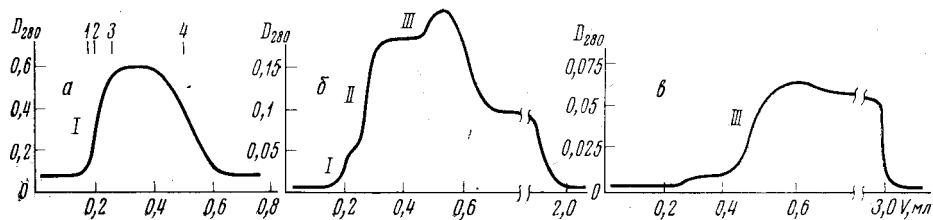


Рис. 2. Хроматография ЛИВ-белка на микроколонке сефадекса G-100 в режиме фронтальной элюции *a* — $[E]_0=30$ мкМ, *b* — $[E]_0=3$ мкМ, *c* — $[E]_0=0,5$ мкМ. Маркеры: 1 — сывороточный альбумин, 2 — яичный альбумин, 3 — α -химотрипсин, 4 — РНКазы. I—III — номера фракций

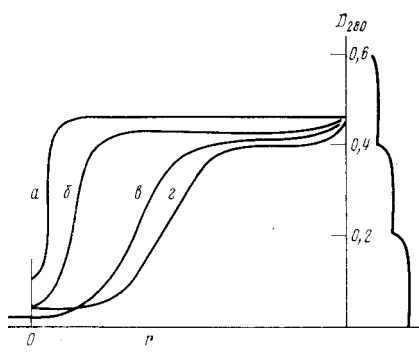


Рис. 3

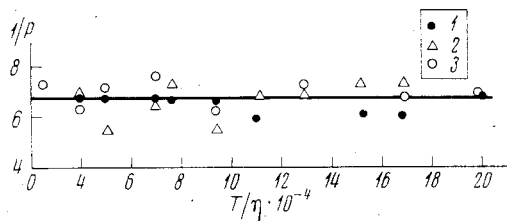


Рис. 4

Рис. 3. Седиментация ЛИВ-белка при 60 000 об/мин. Кривые получены через: *a* — 1, *b* — 51, *c* — 98 и *d* — 159 мин. после достижения максимальной скорости вращения ротора, $E_0=2 \cdot 10^{-5}$ М

Рис. 4. Зависимость $1/P$ от T/η для ЛИВ-белка, полученная в изотермических условиях. Концентрация белка: 1 — $2,6 \cdot 10^{-5}$ М, 2 — $2,6 \cdot 10^{-6}$ М, 3 — $2,6 \cdot 10^{-7}$ М

(рис. 2), причем по мере разбавления исходных растворов белка увеличивается содержание удерживаемых гелем фракций. Использование калиброванной белками с различным молекулярным весом колонки позволило оценить кажущиеся молекулярные веса фракций I—III, которые оказались равными соответственно $\sim 35\,000$, $\sim 20\,000$ и $\sim 15\,000$.

Аналогичная картина наблюдается при препаративном разделении ЛИВ-белка на колонке с сефадексом G-100 ($0,5 \times 60$ см) в обычном режиме элюции водой (наполнили 2 мл белка с концентрацией 2 мг/мл). Было получено три активных фракции, отличающиеся по объему элюции. Определение электрофоретической подвижности белка в этих фракциях, а также исходного белка методом зональной электрофореза в геле полиакриламида в присутствии додецилсульфата натрия, показывает для всех фракций одинаковое значение молекулярного веса равное 35 000. Отсюда следует, что наблюдаемые при гель-фильтрации значения молекулярных весов фракций являются кажущимися и на самом деле минимальный молекулярный вес ЛИВ-белка равен 35000 дальтон, что согласуется с данными других авторов (², ³), а также с наличием лишь одной N-концевой аминокислоты (⁴). Заниженные значения молекулярного веса фракций, очевидно, обусловлены аномальным хроматографическим поведением олигомеров и, возможно, мономера. Такое поведение характерно и для некоторых других связывающих белков (⁷, ⁸).

Опыты по скоростному ультрацентрифугированию ЛИВ-белка проводили на центрифуге Beckman модель E (ротор AN-G) при 60000 об/мин. Как видно из рис. 3, наблюдается заметное размывание подвижной границы и понижение концентрации белка вдоль ячейки, свидетельствующее о наличии быстро седиментирующих частиц.

Наконец, измерение поляризации флуоресценции остатков триптофана в белке (возбуждение при $\lambda=280$ нм, эмиссия при $\lambda=337$ нм, спектрофлуориметр Hitachi) показывает, что время вращательной релаксации ЛИВ-белка (ρ_n) не зависит от вязкости среды (рис. 4). Значение времени жизни возбужденного состояния (τ) лежит в области обычной для белков (3,8 нсек.). Эти данные также согласуются с представлением об агрегации ЛИВ-белка.

Таким образом полученные нами данные свидетельствуют, что связывание лейцина ЛИВ-белком зависит от степени олигомеризации белка, которая в свою очередь определяется концентрацией белка и концентрацией субстрата. Как уже указывалось, в литературе (², ³) приводятся различающиеся на порядок значения $K_{D(\text{важ})}$ ЛИВ-белка. Авторы цитированных работ использовали близкие концентрации белка (3 и 7 мкМ, соответственно), но сильно различающиеся интервалы концентраций субстрата, а именно 0,05–1 мкМ (²) и 0,25–10 мкМ (³). Это соответствует областям «низкой» и «высокой» концентраций субстрата, использованных в наших экспериментах (табл. 1) и объясняет полученные в этих работах различные значения $K_{D(\text{важ})}$.

Следует отметить, что аномалия связывающих свойств ЛИВ-белка четко проявляется при весьма низких концентрациях белка и относительно высоких концентрациях субстрата, т. е. в той области, которая до сих пор практически не исследовалась.

Описанные нами свойства ЛИВ-белка весьма сходны со свойствами галактозасвязывающего белка (⁶), однако, в этом случае предполагается существование двух конформеров, отличающихся по сродству к субстрату. Авторы (⁶) исключают ассоциацию белка в основном потому, что им не удалось обнаружить форм с молекулярным весом выше 36000. Учитывая, однако, аномалии хроматографического поведения некоторых связывающих белков, этот вопрос нельзя считать решенным.

В настоящее время нет достаточных оснований утверждать, что обнаруженная нами зависимость связывающих свойств имеет функциональное значение. Заманчивым представляется предположение, что такое поведение связывающего белка может иметь значение для регуляции его активности. В этой связи следует отметить, что количество ЛИВ-белка в клетке и уровень транспорта лейцина в клетку (а также внутриклеточное содержание этой аминокислоты (⁹)) изменяются противоположным образом в ходе роста культуры *E. coli* (¹). При этом малые количества ЛИВ-белка на логарифмической фазе роста могут обеспечить высокий уровень транспорта или сохранение высокой внутриклеточной концентрации лейцина.

Авторы выражают благодарность Б. Г. Белецькому за помощь в проведении микроколоночной хроматографии ЛИВ-белка, а также Л. С. Шкаренковой, участвовавшей в некоторых этапах этой работы.

Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. L. Oxender, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 777 (1972). ² W. R. Penrose, G. E. Nicholds et al., J. Biol. Chem., v. 243, 5921 (1968). ³ Y. Anraku, J. Biol. Chem., v. 243, 3116 (1968). ⁴ В. К. Антонов, Е. Л. Арсеньева и др., Биохимия, т. 38, 1294 (1973). ⁵ K. Berman, P. D. Boyer, Biochemistry, v. 11, 4650 (1972). ⁶ W. Boos, A. S. Gordon et al., J. Biol. Chem., v. 247, 917 (1972). ⁷ H. Kuzuya, K. Bromwell, G. Guroff, J. Biol. Chem., v. 246, 6371 (1971). ⁸ E. A. Berger, L. A. Heppel, J. Biol. Chem., v. 247, 7684 (1972). ⁹ R. Raunio, H. Rosenqvist, Acta Chem. Scand., v. 24, 2737 (1970).