

УДК 577.152:577.166

БИОХИМИЯ

К. А. Шагинян, И. А. Алехина, С. Г. Газелян, Н. П. Денцова

Протеиназы высшего базидномицета *Coprinus 7N*

(Представлено академиком АН Армянской ССР В. О. Казаряном 23/IV 1989)

В последние годы возрос интерес к изучению культур высших базидиальных грибов как источников биологически активных соединений, в том числе протеиназ, обладающих фибринолитическим и тромболитическим действием (¹).

Исследования литического действия ферментного препарата из базидномицета *Coprinus 7N* при экспериментальном тромбозе показали, что данный препарат вызывал отчетливую стимуляцию фибринолитической системы и обладал прямым тромболитическим действием. По-видимому, в механизме наблюдаемых явлений определенное значение имеет как непосредственное фибринолитическое действие препарата, так и возможная активация эндогенного плазминогена (²).

Настоящая работа посвящена изучению компонентного состава ферментного комплекса базидномицета *Coprinus 7N*, проявляющего высокую протеолитическую активность по гидролизу фибрина.

Материалом исследования служил культуральный фильтрат высшего базидиального гриба штамма *Coprinus 7N* из коллекции Ботанического института им. В. Л. Комарова АН СССР (Ленинград). Культуру выращивали в течение 120 ч при 26°C на круговой качалке (120 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 1 л, содержащих 0,15 л глюкозо-пептонной питательной среды (³).

Определение активности сериновой протеиназы проводили по гидролизу хромогенного пептидного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA (⁴), активность металлопротеиназ определяли по гидролизу синтетического пептидного субстрата DNP-Gly-Gly-Val-Arg (⁵). Протеолитическую активность определяли также по гидролизу азоказеина (⁶), фибрина (⁷), искусственных тромбов (⁸), а также по свертыванию молока (⁹).

Диск-электрофорез проводили в 7,5%-ном полиакриламидном геле с pH разделения 9,5 по методу Девиса (¹⁰). Электрофорез проводили в стеклянных трубках (4×140 мм) в течение 4—4,5 ч при силе тока 4 мА на трубку при 4°C. Электрофоретическую подвижность определяли относительно маркера—бромфенолового синего. Окрашивание белковых зон проводили 0,5%-ным раствором кумасси бриллиантового голубого G—250 в 30%-ной трихлоруксусной кислоте в течение 10 мин. Избыток красителя удаляли промыванием геля 7,5%-ной уксусной кислотой. Сканирование гелей проводили при 633 нм на приборе Ultrosan XI. Laser Densitometer фирмы LKB (Швеция).

Для определения локализации протеиназ в полнакриламидном геле после электрофореза последние разрезали на сегменты длиной 3 мм. Затем в каждом сегменте определяли протеолитическую активность по гидролизу соответствующих субстратов в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 8,5, содержащем 2 мМ CaCl_2 , вышеуказанными методами.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (1,6×70 см) с сефадексом G-75 (сверхтонкий), предварительно уравновешенной 50 мМ трис-НСl буфером, рН 8,0, содержащим 0,15 М NaCl и 2 мМ CaCl_2 . Для определения молекулярной массы в качестве белковых стандартов использовали калибровочный набор фирмы Pharmacia (Швеция). Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана, а полный объем — с помощью CuSO_4 .

Нами впервые обнаружено, что культуральный фильтрат базидиомицета *Coprinus 7N* содержит протеиназы, проявляющие ферментативную активность по гидролизу специфических синтетических хромогенных пептидных субстратов субтилизинподобных сериновых протеиназ и термолитиноподобных металлопротеиназ, соответственно, Z-Ala-Ala-Leu-pNA и DNP-Gly-Gly-Val-Ag. Исследуемый культуральный фильтрат проявляет также высокую протеолитическую активность по гидролизу белковых субстратов — казеина, фибрина, искусственных тромбов, обладает высокой молокосвертывающей активностью.

Изучение динамики роста культуры *Coprinus 7N* и кинетики накопления протеиназ показало, что накопление активности протеиназ, гидролизующих Z-Ala-Ala-Leu-pNA, казеин, фибрин и тромбы, по времени совпадает с накоплением биомассы, достигая максимума в конце логарифмической фазы роста (рис. 1). В дальнейших исследованиях использовали культуральный фильтрат, выращенный до начала стационарной фазы роста.

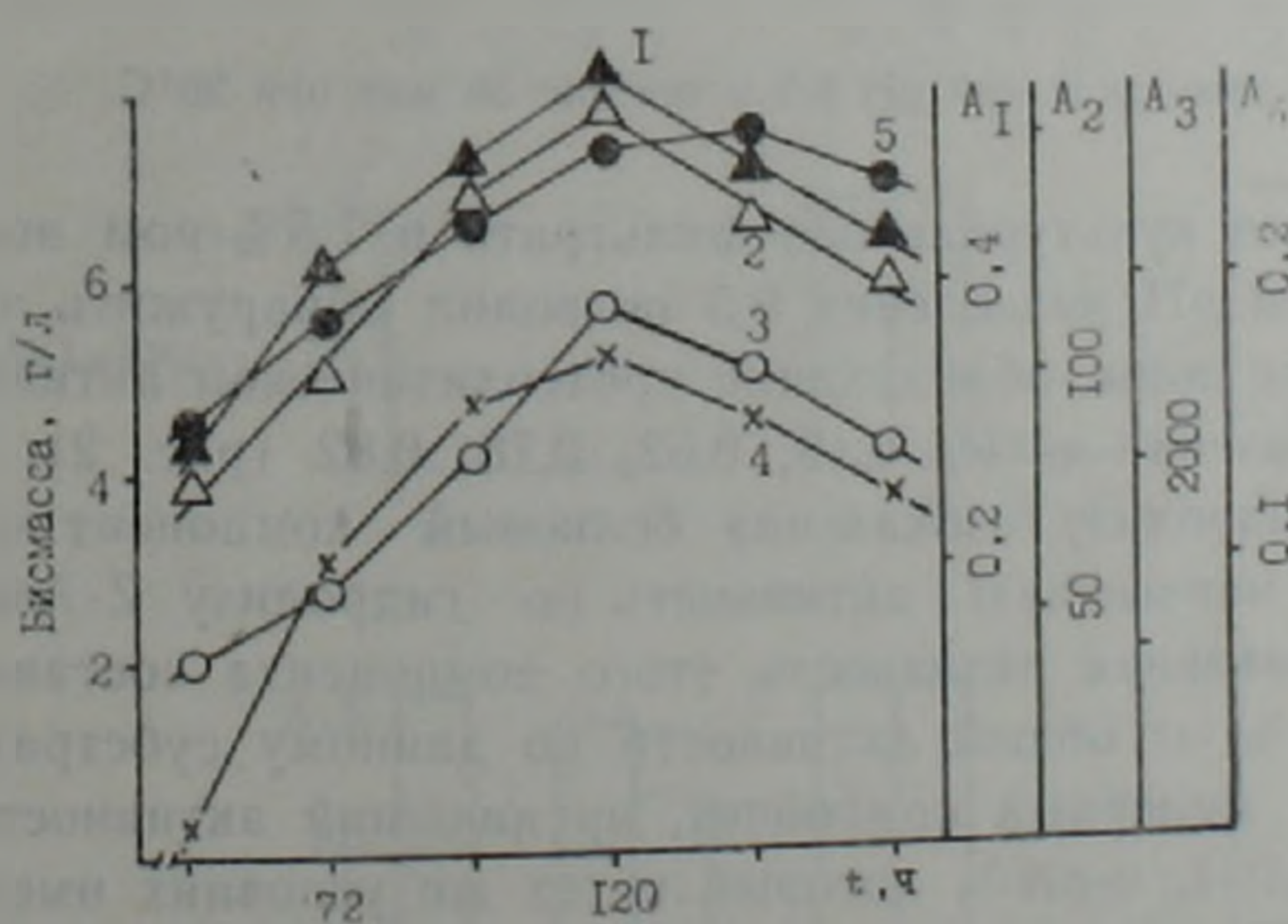


Рис. 1. Динамика накопления протеолитической активности в культуральном фильтрате *Coprinus 7N* по гидролизу: 1 — казеин (A_1 , ед/мл), 2 — тромбы (A_2 , усл. ед), 3 — фибрин (A_3 , усл. ед/мл), 4 — хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA (A_4 , ед/мл); 5 — биомасса (г/л)

Исследование влияния на ферментативную активность культурального фильтрата *Corynebacterium* 7N ингибиторов сериновых и металлопротеиназ, соответственно фенилметилсульфонилфторида и 1,10-фенантролина, показало, что одновременное использование этих реагентов приводит к полному блокированию ферментативной активности протеиназ, активных по гидролизу фибрина, азоказеина, Z-Ala-Ala-Leu-pNA и свертыванию молока при pH 8,0 (таблица). Таким образом, в гидролизе фибрина и азоказеина в слабощелочной среде основное участие принимают протеиназы двух типов—металлопротеиназы и сериновые протеиназы. Вклад этих ферментов примерно одинаков и составляет, соответственно, 42 и 30% от общей протеолитической активности по гидролизу азоказеина. Интересно отметить, что молоко-свертывающая активность полностью блокировалась под действием 5 мМ фенилметилсульфонилфторида, в то время как 10 мМ 1,10-фенантролина не оказывали ингибирующего действия. Последнее свидетельствует о том, что молоко-свертывающая активность обусловлена наличием в культуральном фильтрате *Corynebacterium* 7N сериновой протеиназы.

Ингибирование протеиназ культурального фильтрата *Corynebacterium* 7N

	Активность по субстратам, %			
	фибрин	азоказеин	молоко	Z-Ala-Ala-Leu-pNA
Исходный культуральный фильтрат	100	100	100	100
Остаточная активность после ингибирования				
1,10-фенантролином (10 мМ)	40	30	100	90
Фенилметилсульфонилфторидом (5 мМ)	72	42	0	0
1,10-фенантролином (10 мМ) и фенилметилсульфонилфторидом (5 мМ)	0	0	0	0

Ингибирование проводили при pH 8,5 в течение 30 мин при 20°C.

Электрофорез культурального фильтрата в 7,5%-ном полиакриламидном геле при pH разделения 9,5 позволил обнаружить четыре основные белковые зоны, обладающие протеолитической активностью по гидролизу азоказеина с R_f 0,19; 0,62; 0,78; 0,82 (рис. 2). Наиболее активный по гидролизу азоказеина белковый компонент с R_f 0,19 проявил также наивысшую активность по гидролизу Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Ферментативная активность этого компонента составляла приблизительно 70% от общей активности по данному субстрату. Также был обнаружен минорный компонент, проявивший активность по гидролизу Z-Ala-Ala-Leu-pNA, который в тех же условиях имел R_f 0,62.

Помимо азоказеина и Z-Ala-Ala-Leu-pNA ферменты культурального фильтрата гидролизовали также DNP-Gly-Gly-Val-Arg. Гидролиз этого пептида с расщеплением связи Gly-Val характерен для металлопротеиназ, например таких, как термолизин из *Bacillus thermoproteolyticus* (¹¹), металлопротеиназы *Bac. subtilis* (¹²), а также металлопротеиназы высшего базидиомицета *Flammulina velutipes* (¹³). Наи-

и высокую протективную активность по данному субстрату на акцели в зонах с R_f 0,78 и 0,82, в которых была обнаружена активность по гидролизу азоказеина.

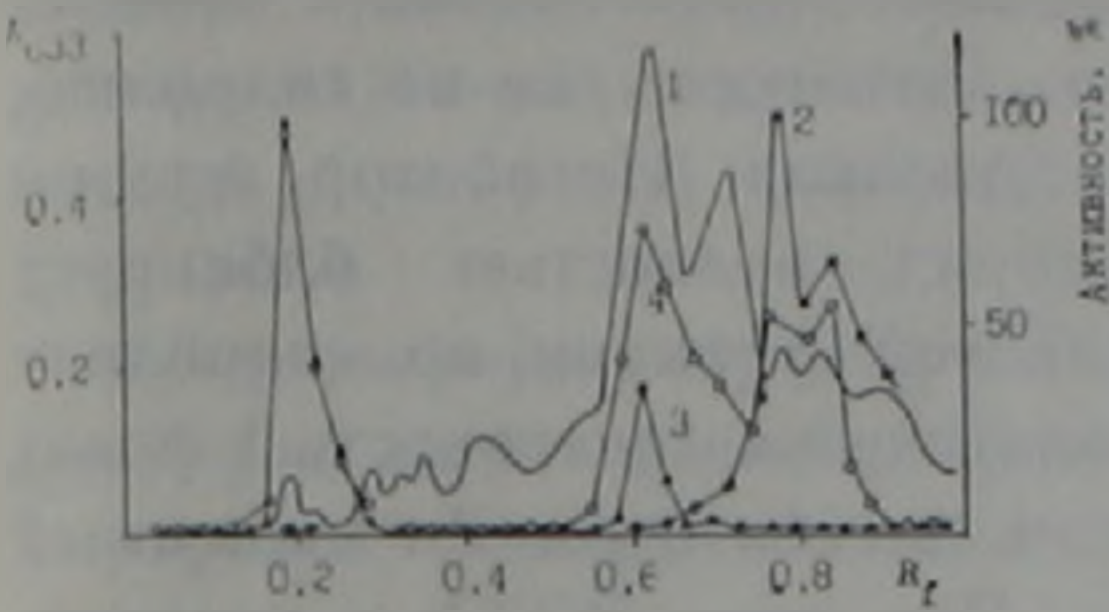


Рис. 2. Определение протеолитической активности в сегментах геля после диск-электрофореза культурального фильтрата *Sordaria* 7N. 1—поглощение A_{633} (сканирование окрашенного геля), активности по гидролизу: 2—DNP-Gly-Gly-Val-Arg, 3—Ala-Ala-Leu-pNA, 4—азоказеин

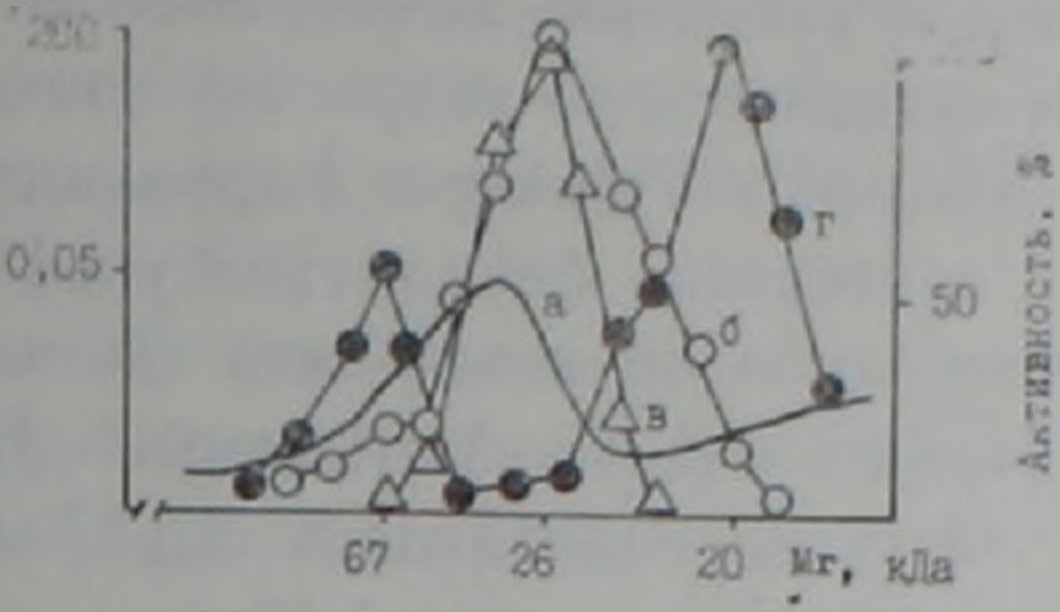


Рис. 3. Фракционирование протеиназ культурального фильтрата *Sordaria* 7N на сефадексе G-75. а—поглощение A_{633} ; активности по гидролизу: б—азоказеин, в—Z-Ala-Ala-Leu-pNA, г—DNP-Gly-Gly-Val-Arg

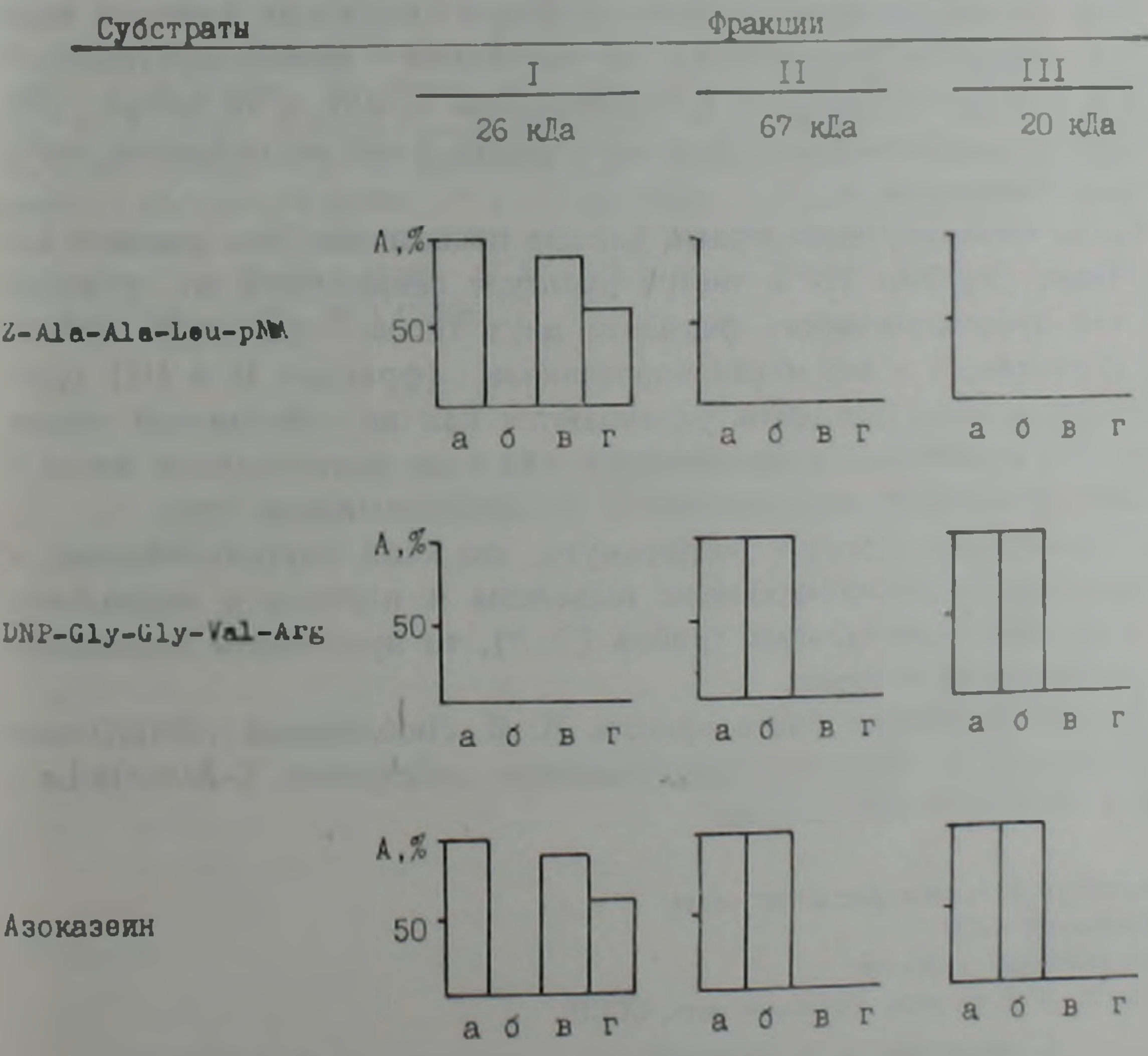


Рис. 4. Влияние ингибиторов на протеолитическую активность культурального фильтрата *Sordaria* 7N, фракционированного на сефадексе G-75, а—активность нативного фермента, %; б—остаточная активность после действия фенилметилсульфонилфторида (2 мМ); в—1,10-фенантролина (5 мМ); г—ЭДТА (5 мМ)

При фракционировании культурального фильтрата *Coprinus 7N* с помощью гель-фильтрации на сефадексе G—75 обнаружен один пик ферментативной активности по гидролизу Z-Ala-Ala-Leu-pNA (рис. 3). Молекулярная масса, определенная для наиболее активной белковой фракции (I), равна 26 000. Этой же фракции соответствовала и наивысшая активность по гидролизу азоказеина. Активность же по гидролизу DNP-Gly-Gly-Val-Arg в I фракции отсутствовала. Ингибитор сериновых протеиназ, фенилметилсульфонилфторид, полностью блокирует ферментативную активность данной белковой фракции по гидролизу азоказеина и Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Протеолитическая активность I фракции частично подавлялась ЭДТА и таким ингибитором Zn-зависимых металлопротеиназ, как 1,10-фенантролин. При этом ЭДТА в концентрации 5 мМ подавляла ферментативную активность приблизительно на 40 %, а 1,10-фенантролин (5 мМ)—на 10% (рис. 4).

В результате гель-фильтрации также были обнаружены два пика активности по гидролизу специфического синтетического субстрата металлопротеиназ—DNP-Gly-Gly-Val-Arg (фракции II и III). Более активной по гидролизу DNP-Gly-Gly-Val-Arg III фракции соответствовала молекулярная масса 20 000, менее активной II фракции—67 000. При этом ферментативная активность данных белковых фракций полностью подавлялась типичными ингибиторами металлопротеиназ—ЭДТА и 1,10-фенантролином в концентрации 5 мМ, в то время как фенилметилсульфонилфторид в концентрации 2 мМ не оказывал ингибирующего действия.

Таким образом, приведенные данные показывают, что высший базидиомицет *Coprinus 7N* в чистой культуре секретирует по крайней мере три протеолитических фермента двух типов—сериновую протеиназу (фракция I) и две металлопротеиназы (фракции II и III) (рис. 4). Обнаруженные ферменты различаются как по субстратной специфичности и отношению к ингибиторам, так и по молекулярной массе и электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле.

В заключение следует подчеркнуть, что если внутриклеточные и внеклеточные металлопротеиназы выделены и изучены у нескольких видов высших базидиальных грибов (14, 15), то протеиназы серинового типа обнаружены впервые.

Авторы выражают благодарность Л. Я. Люблинской (ВНИИгенетики, Москва) за любезное предоставление субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNA и DNP-Gly-Gly-Val-Arg.

Институт ботаники Академии наук
Армянской ССР
Ботанический институт
им. В. Л. Комарова Академии наук СССР,

Կ. Ա. ՇԱՀԻՆՅԱՆ, Ի. Ա. ԱՎՅՈՆՅԱՆ, Ս. Հ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Ն. Պ. ԿԵՆԵՐՈՎԱ

Coprinus 7N բարձրակարգ բազիդիոմիցետի պրոտեինազները

Ստամենատիրվել է *Coprinus 7N* բարձրակարգ բազիդիալ սնկի ֆերմենտային համակարգի բաղադրակազմը, որը ցուցաբերում է ֆերրինի հեղրման բարձր ակտիվություն:

Յույց է տրված, որ տվյալ կուլտուրան սինթեզում է թույլ հիմնային միջափայրում բարձր ակտիվություն ցուցաբերող երկու տիպի պրոտեինազների Առաջին տիպին վերաբերվում են թերմոլիզինանման մետալոպրոտեինազայի սուբստրատը՝ DNP—Gly—Gly—Val—Arg ճեղքող երկու մետալոպրոտեինազների իրերորդ տիպին վերաբերվում է 26000 մոլ. զանգվածով սերինային պրոտեինազան, որը ճեղքում է սուբստրիզինանման սերինային պրոտեինազայի յուրահատուկ սինթետիկ պեպտիդային սուբստրատը՝ Z—Ala—Ala—Leu—pNA.

Բարձրակարգ բազիդիալ սնկերի մոտ մեր կողմից առաջին անգամ հայտնաբերված սերինային տիպի պրոտեինազան հատուկ հետաքրքրույթուն է ներկայացնում հետագա ուսումնասիրությունների համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Դ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ Н. Н. Фалина, Э. Н. Морозова, Н. П. Денисова и др., Прикл. биохимия и микробиология, т. 14, вып. 5 (1978). ² Н. Н. Петрищев, В. Н. Михайлов, Н. П. Денисова и др., Вестник хирургии, т. 138, № 2 (1987). ³ Н. Н. Фалина, Микол. и фитопатол., т. 14, вып. 1 (1980). ⁴ Л. А. Люблинская, Л. Д. Якушева, В. М. Степанов, Биоорганическая химия, т. 3, № 2 (1977). ⁵ Г. Г. Честухина, О. П. Загитъко, Л. П. Ревина и др., Биохимия, т. 50, № 10 (1985). ⁶ B. Dod, G. Balassa, E. Raulet e. a., Mol. Gen. Genet., v. 163, p. 45 (1978). ⁷ T. Astrup, S. Mullertz, Arch. Biochem. Biophys., v. 40, № 2 (1952). ⁸ А. А. Ившенецкий, С. З. Броцкая, Микробиология, т. 28, № 6 (1969). ⁹ M. Kawai, N. Mukai, Agr. Biol. Chem., v. 34, № 2 (1970). ¹⁰ B. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404 (1964). ¹¹ H. Matsubara, Meth. Enzymol., v. 19, p. 642 (1970). ¹² К. А. Шагинян, Л. С. Изотова, Ю. В. Йомонтас и др., Биохимия, т. 45, вып. 11 (1980). ¹³ Э. Н. Морозова, Н. Н. Фалина, Н. П. Денисова и др., Биохимия, т. 47, вып. 7 (1982). ¹⁴ T. Terashita, K. Oda, M. Kono e. a., Agr. Biol. Chem., v. 49, № 8 (1985). ¹⁵ T. Terashita, K. Oda, M. Kono e. a., Trans. Mycol. Soc. Jpn., v. 26, № 3 (1985).