

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.23

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ 2 МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

© 2017 г. А. В. Вахрушева^{1,4}, В. А. Немашкалов², О. В. Кравченко¹, С. В. Тищенко¹,
А. Г. Габдулхаков¹, В. Г. Кляшторный¹, О. Г. Короткова³, А. В. Гусаков^{3,4}, А. П. Синицын^{3,4}

¹ Институт белка РАН, Пуцзино

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пуцзино

³ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

E-mail: vakhrusheva.ann@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.08.2016 г.

Для эффективного животноводства в кормах сельскохозяйственных животных важно использовать ферментные добавки, помогающие расщеплять некрахмальные полисахариды клеточной стенки злаковых растений, которые составляют основу комбикормов. Некрахмальные полисахариды обладают свойствами, затрудняющими эффективное переваривание и усваивание кормов животными. Поэтому улучшение свойств и характеристик ферментных добавок является актуальной задачей. Определена пространственная структура одного из ключевых промышленных ферментов, участвующих в расщеплении некрахмальных полисахаридов, эндоглюканазы 2 мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* (PDB код 5I6S). Также установлен каталитический центр данного фермента и на основе полученной структуры сделано предположение о возможностях сдвига рН-оптимума фермента из кислой области в нейтрально-щелочную.

DOI: 10.7868/S0023476117020308

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время использование ферментных препаратов в качестве кормовой добавки является важным условием эффективного животноводства [1]. Основа комбикормов – это злаковые культуры, такие как овес, рожь, пшеница, ячмень и другие, клеточная стенка которых содержит в своем составе трудноращепляемые некрахмальные полисахариды (НПС) [2]. НПС можно условно разделить на нерастворимые и растворимые в пищеварительной системе животных. И те и другие проявляют так называемые «антипитательные» свойства. Нерастворимые НПС, являясь весьма устойчивыми соединениями, образуют прочную матрицу, окружающую питательные вещества, такие как крахмал и белок, и препятствуют доступу к ним амилаз и протеаз, что приводит к снижению питательной ценности кормов. Растворимые НПС образуют вязкие гели, уменьшающие скорость прохождения корма по пищеварительному тракту, его переваримость и эффективность всасывания питательных веществ [1].

Ключевыми ферментами, используемыми в качестве кормовой добавки для расщепления растворимых НПС, являются β-глюканазы, в число которых входят эндо-1,4-β-глюканазы. В каче-

стве промышленно важных продуцентов данных ферментов используются грибы из родов *Trichoderma* и *Penicillium*. На сегодняшний день последние особенно перспективны благодаря своей продуктивности и способности синтезировать активный и сбалансированный по своему составу ферментный комплекс, а также высокой технологической стабильности индивидуальных компонентов этого комплекса [3].

Ранее было показано, что к ряду перспективных ферментов, обладающих высокой удельной активностью по отношению к растворимым НПС (в частности, β-глюкану ячменя), относится эндо-1,4-β-глюканаза *Penicillium verruculosum* (ЭГ2), гидролизующая внутренние β-1,4-гликозидные связи [4]. По классификации базы данных Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) ЭГ2 относится к пятому семейству гликозидгидролаз (Cel5A) [5], для которого характерен механизм расщепления экваториальной гликозидной связи при участии двух боковых карбоксильных групп остатков глутаминовой кислоты с сохранением аномерной конфигурации субстрата [6].

К настоящему времени определены пространственные структуры ряда ферментов из пятого семейства гликозидгидролаз [7–12]. Также был описан механизм реакции гидролиза гликозид-

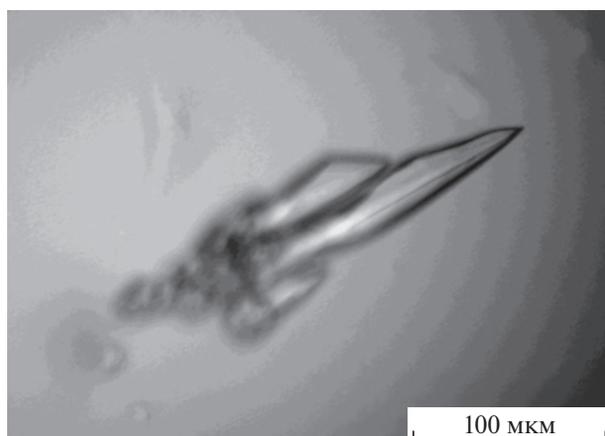


Рис. 1. Кристаллы ЭГ2.

ной связи [13] и определены аминокислотные остатки (**а.о.**), формирующие каталитический центр ферментов данного семейства [7–12], характерные и для ЭГ2.

В данной работе определена пространственная структура изолированной ЭГ2 из *P. verruculosum*. Информация о структурных особенностях ЭГ2 должна стать основой для работ по сайт-направленному мутагенезу фермента с целью придания ему нужных свойств (сдвиг температурного и рН-оптимумов активности фермента, модификация субстратной специфичности, степени гликозилирования и т.д.), а также увеличения его активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наработка и выделение белка

Штамм микроорганизма. В качестве продуцента ЭГ2 был использован рекомбинантный штамм мицелиального гриба *P. verruculosum* ЭГ2, полученный в результате трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (niaD-) генетической конструкцией, несущей ген гомологичной ЭГ2.

Ферментный препарат. Использован сухой ферментный препарат, полученный ультрафильтрацией и сублимационным высушиванием культуральной жидкости. Культивирование продуцента осуществляли в ферментере с рабочим объемом 1 л ферментационной установки КФ-108 в ИБФМ РАН (г. Пушкино).

Выделение и очистку ЭГ2 проводили методом хроматографии. Навеску ферментного препарата растворяли в 0.1 М Na-ацетатном буфере, рН 5.0, центрифугировали и обессоливали с заменой буфера с помощью гель-проникающей хроматографии на носителе Bio-Gel P-6 фирмы Bio-Rad (США) в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl, рН 6.9.

Для фракционирования использовали колонку с анионообменным носителем Source 15Q и FPLC-систему фирмы Pharmacia (Швеция). Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris/HCl при рН 6.9; связавшиеся белки элюировали в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.4 М. Полученные в ходе элюирования фракции исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-ЭФ).

Масс-спектрометрический анализ трипсиновых гидролизатов. Для идентификации исследуемого белка использовали масс-спектрометрический анализ трипсинового гидролизата. После ДДС-ЭФ из соответствующей полосы геля вырезали фрагмент, который отмывали от красителя и других веществ водно-органическим раствором бикарбоната аммония, сушили ацетонитрилом. Затем его обрабатывали трипсином (50 мМ NH₄HCO₃, трипсин, модифицированный свиной 5 мкг/мл, Promega, США). Полученные пептиды экстрагировали из геля и получали MALDI-TOF масс-спектры, используя систему AUTOFLEX II (Bruker Daltonics, Германия) в лаборатории физико-химических методов анализа строения вещества химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Анализ полученных масс-спектров и идентификацию фермента осуществляли с помощью онлайн-сервиса FindPept [14].

Кристаллизация. ЭГ2 растворяли в деионизованной воде до концентрации 12–17 мг/мл. Кристаллизация белка велась методом диффузии паров в его модификации “висящая капля”. Кристаллы были получены при использовании набора JBC Screen Nuc-Pro2 (Jena Bioscience) в условиях C3 (20% PEG 6K, Bis-Tris-Propane, рН 7.0, 7% MPD, 5% v/v tert-butanol). Для получения кристаллов смешивали 4 мкл раствора белка с 1 мкл раствора C3 JBC Screen Nuc-Pro2 и 0.5 мкл 6% ММЕPEG 5K. В качестве противораствора использовали 18% PEG 6K, Bis-Tris-Propane, рН 7.0. Кристаллизацию проводили при температуре 12°C. Через два–три дня появлялись кристаллы, которые дорастали до максимального размера (50 × 30 × 400 мкм) в течение недели (рис. 1). Перед съемкой кристаллов в жидком азоте при 110 К их переносили в криоразтвор 30% PEG 6K, Bis-Tris-Propane, рН 7.0, 7% MPD, 5% v/v tert-butanol.

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционные данные были собраны от одного кристалла на лабораторной рентгеновской установке в Институте белка, состоящей из генератора с вращающимся анодом Proteum X8, снабженного фокусирующей системой Montel 200 (производство фирмы Bruker), и CCD-детектора PLATINUM 135 (производство фирмы Bruker). При съемке данных напряжение генератора составляло 45 кВ, сила тока 40 мА, диаметр пучка

0.2 мм, расстояние кристалл–детектор 45 мм, угол осцилляции равен 0.5° . Набор обработан в программном комплексе Proteum2 [15]. Во время съемки кристалл был охлажден в струе жидкого азота до температуры 110 К. Характеристики дифракционных данных приведены в табл. 1. От кристаллов белка ЭГ2, принадлежащих пр. гр. $P4_12_12$, получен дифракционный набор отражений до разрешения 2.1 Å. Значение коэффициента Метьюза (V_m) попадает в разрешенную область, если предположить, что в асимметричной части ячейки находится одна молекула белка. В этом случае $V_m = 2.12 \text{ \AA}^3/\text{Да}$, содержание растворителя составляет 42.0%.

Определение пространственной структуры белка. Структура белка решена методом молекулярного замещения с использованием программы PHASER [16]. В качестве стартовой модели использовалась модель структуры эндогликоканазы из *Thermoascus aurantiacus* (PDB код 1GZJ). Степень идентичности аминокислотных последовательностей этих белков составляет 69%. Начальная модель была подвергнута нескольким циклам ручной правки и кристаллографического уточнения с помощью программ COOT [17] и REFMAC [18], а окончательное уточнение было проведено в программе PHENIX [19]. Статистика уточнения приведена в табл. 1.

Окончательная модель, уточненная до $R_{cryst} = 21.8\%$ и $R_{free} = 26.0\%$ при разрешении 2.1 Å, содержит 314 а.о., две молекулы N-ацетилглюкозамина, одну молекулу маннозы, 146 молекул воды. Полученная модель обладает хорошими стереохимическими параметрами и не содержит а.о., лежащих в запрещенных областях карты Рамачандрана. Координаты модели депонированы в банк белковых структур (PDB код 5I6S). Рисунки выполнены с помощью программы PyMOL [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ЭГ2 – однодоменный белок, состоящий из 314 а.о. Данный фермент является секретиремым гликопротеином и имеет сигнальную последовательность длиной в 18 а.о., которая отщепляется во время посттрансляционной модификации (рис. 2а). Как и в других определенных ранее пространственных структурах эндогликоканаз [9], электронная плотность для первых девяти N-концевых а.о. отсутствует вследствие их подвижности. В полученной структуре ЭГ2 к одному из потенциальных сайтов гликозилирования (N42) ковалентно присоединены последовательно две молекулы N-ацетилглюкозамина и одна молекула маннозы.

ЭГ2 относится к классу α/β -белков, подклассу так называемых TIM (β/α)₈-бочонков. Восемь β -тяжей формируют параллельный β -лист внутри

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения ЭГ2

Статистика набора	
Пр. гр.	$P4_12_12$
$a = b, c, \text{ \AA}; \alpha = \beta = \gamma, \text{ град}$	83.82, 89.0; 90.0
$\lambda, \text{ \AA}$	1.54
Пределы разрешения, Å	24.22–2.10 (2.20–2.10)
Общее число отражений	210 554 (18230)
Число уникальных отражений	19 130 (2421)
Полнота набора, %	99.9 (100.0)
$R_{merge}, \%$	7.1 (53.7)
Избыточность	11.0 (7.53)
Среднее $I/\delta(I)$	10.96 (1.83)
Мозаичность, град	0.72
Статистика уточнения	
Диапазон разрешения, Å	24.22–2.10 (2.21–2.10)
Число молекул в асимметричной части	1
Число отражений	19 007 (611)
Размер тестовой выборки, %	5
$R_{cryst}, \%$	21.8 (30.2)
$R_{free}, \%$	26.09 (37.4)
Средний температурный фактор, Å ²	29.6
Среднеквадратичные отклонения:	
Длины связей, Å	0.005
Валентные углы, Å	0.766
Число остатков на карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	97.4
Дополнительно разрешенные районы, %	2.6

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

белка, а восемь α -спиралей находятся на поверхности белка; α -спирали и β -тяжи чередуются друг с другом, N- и C-концы белка сближены. Линейные размеры белка составляют в среднем 42 на 35 Å, диаметр около 42 Å, толщина 22 Å (рис. 2б).

Гидрофобное ядро ЭГ2 в основном сформировано внутренними поверхностями α -спиралей и внешними поверхностями β -тяжей. Данный белок не имеет сквозного канала. Внутреннюю поверхность β -бочонка можно разделить на нижнюю часть, сформированную преимущественно гидрофобными аминокислотами, и верхнюю часть, находящуюся близко к каталитическому

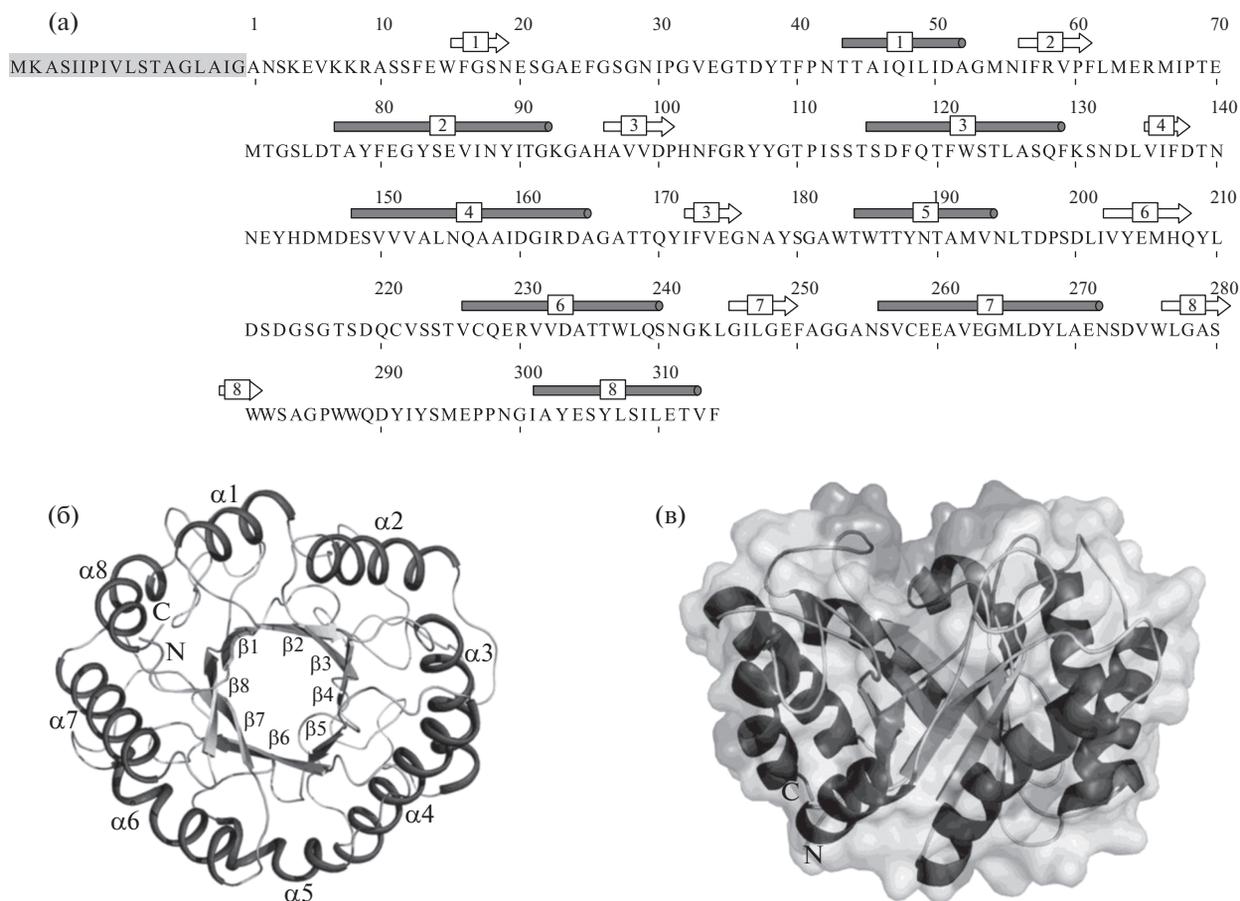


Рис. 2. Аминокислотная последовательность ЭГ2. β -тяжи показаны стрелками, α -спирали – цилиндрами. Сигнальная последовательность белка выделена серой рамкой. Вертикальной стрелкой показан сайт гликозилирования (а). Пространственная структура ЭГ2 (вид сверху) (б). Общий вид ЭГ2 (вид сбоку). На верхней части поверхности белка темным выделен желобок, где происходит связывание и расщепление субстрата (в).

центру белка и состоящую в основном из гидрофильных а.о.

На рис. 2в представлен общий вид ЭГ2. Как видно из структуры, на поверхности белка располагается желобок, в котором происходит связывание субстрата. В середине желобка находится каталитический центр, где происходит расщепление O-гликозидной связи полисахаридов.

Каталитический центр ЭГ2. Общий принцип реакции расщепления гликозидной связи полисахаридов для большинства гликозидгидролаз был описан впервые в 1953 г. [13], позднее подтвержден и уточнен с использованием пространственных структур эндогликоканазы из *Bacillus agaradhaerens*, PDB-код структуры – 7A3N [8]. Данная реакция проходит по механизму двойного замещения при участии двух карбоксилатов, один из которых выступает в качестве донора протона, а другой в качестве нуклеофила. Сначала возникает первое промежуточное состояние, при котором β -1,4-гликозидная связь ослабляется за счет протонирования от E139, вследствие чего часть

сахара отщепляется. Затем E228 “атакует” сахар в положении C₁, формируется ковалентная связь фермента с сахаром, и образуется так называемый гликозил-ферментный интермедиат. Далее полученный интермедиат реагирует с водой, в результате чего образуется второй промежуточный комплекс, который затем гидролизуется до первоначального вида [8].

При наложении пространственной структуры ЭГ2 на структуру эндогликоканазы *B. agaradhaerens* по C α -атомам rmsd составило 2.2 Å. В целом наблюдается сохранение общего хода полипептидной цепи, совпадение α -спиралей и β -тяжей, но заметна вариабельность в петлях между первой, шестой и восьмой α -спиралями и первым, шестым и восьмым β -тяжами соответственно; кроме того, в структуре эндогликоканазы *B. agaradhaerens* на N-конце присутствуют дополнительная α -спираль (V5-H9) и два β -тяжа (S13-S15 и E18-V20).

Как видно из сопоставления каталитических центров ЭГ2 и эндогликоканазы *B. agaradhaerens* (рис. 3), конформации остатков глутаминовой

кислоты, участвующих в реакции расщепления гликозидной связи, в эндоглиуканазах *B. agaradhaerens* (E139 и E228) совпадают с конформациями соответствующих остатков в ЭГ2 (E142 и E249). Кроме того, совпадают положения других а.о., формирующих каталитический центр фермента и удерживающих полисахарид в данном месте, а именно H101, H200, N138, Y202, W262 в ВА-ЭГ и H102, H207, N141, Y209, W282 в ЭГ2 соответственно. Из этого можно сделать вывод, что реакция у ЭГ2 проходит по описанному выше механизму, характерному для пятого семейства гликозидгидролаз.

ЭГ2 обладает повышенной удельной активностью (19.7 ед. на мг белка) по основному модельному субстрату, карбоксиметилцеллюлозе, по сравнению с другими эндоглиуканазами из ферментного комплекса мицелиального гриба *P. verruculosum* [20], что делает его перспективным промышленно значимым ферментом. Одним из преимуществ промышленных ферментов является их устойчивость в широком диапазоне рН.

ЭГ2 имеет рН-оптимум в районе 4.5. На основании полученной структуры проведен анализ возможности модификации ЭГ2 с целью сдвига рН-оптимума активности фермента в нейтрально-щелочную область. Некоторые грибные эндоглиуканазы (из *Trichoderma reesei*, *Thermoascus aurantiacus*) имеют рН-оптимум ближе к нейтральной области рН, тогда как рН-оптимумы активности бактериальных (в частности, бацильных – *Bacillus sp.*, *B. halodurans*, *B. agaradhaerens*) ферментов из того же семейства находятся в нейтрально-щелочной области.

рН-оптимум фермента, возможно, зависит от его поверхностного заряда, в частности соотношения между общим количеством кислых (Asp +

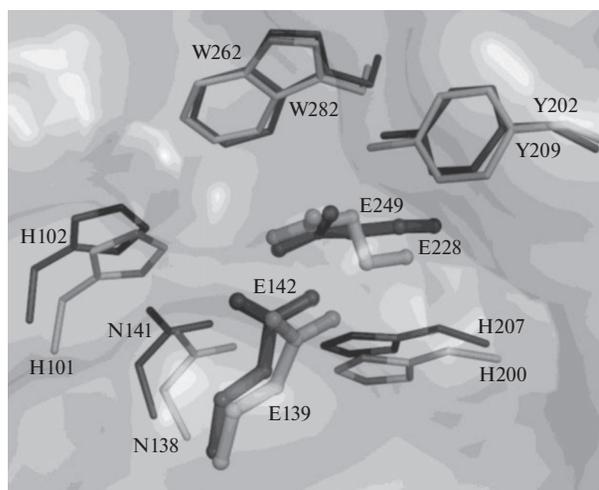


Рис. 3. Наложение пространственной структуры активного центра ЭГ2 (черный цвет), PDB код 5I6S, на пространственную структуру эндоглиуканазы *B. agaradhaerens* (серый цвет), PDB код 7A3N.

+ Glu) и основных (Arg + His + Lys) а.о. на поверхности фермента. В табл. 2 представлен анализ содержания таких аминокислот в ряде эндоглиуканаз из пятого семейства гликозидгидролаз. Видно, что в ЭГ2 соотношение между основными и кислыми аминокислотами сильно сдвинуто в сторону кислых остатков (0.30). Для других грибных ферментов это соотношение не такое большое (0.53–0.81) и сравнимо с таковым для нейтрально-щелочных бацильных ферментов (0.52–0.86). Таким образом, наиболее кислый из рассмотренных ферментов рН-оптимум активности белка ЭГ2, по-видимому, вызван преобладанием у него кислых аминокислот.

Таблица 2. Количество основных и кислых аминокислотных остатков в эндоглиуканазах пятого семейства гликозидгидролаз

	<i>Penicillium verruculosum</i> EG2	<i>Trichoderma reesei</i> EG2	<i>Pyromyces rhizinflatus</i> EG	<i>Thermoascus aurantiacus</i> EG	<i>Bacillus halodurans</i> EG	<i>Bacillus agaradhaerens</i> EG	<i>Bacillus sp.</i> EG
pH-optimium	4.5	4.5–6.0	5.5	6.0	7.0–8.0	7.5–9.0	9.5
Arg	5	8	13	6	17	8	8
His	4	5	9	3	15	8	5
Lys	3	6	24	9	11	10	6
Gln	10	21	8	13	18	12	21
Asp	30	4	49	21	32	38	33
Basic (Arg + His + Lys)	12	19	46	18	43	26	19
Acidic (Asp + Glu)	40	25	57	34	50	50	54
Basic/Acidic	0.30	0.76	0.81	0.53	0.86	0.52	0.59

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определена пространственная структура эндоглюканазы из мицелиального гриба *P. verrucosum* (PDB код 5I6S), а также выявлены ключевые аминокислотные участки, формирующие каталитический центр данного фермента и участвующие в расщеплении гликозидной связи в полисахаридах. Данная структура является основой для получения мутантных форм белка с измененными свойствами, в частности эндоглюканазы, обладающей более высокой активностью.

Кроме того, сделано предположение, что кислый pH-оптимум ЭГ2 вызван преобладанием кислых а.о. (Asp, Glu) при относительно малом содержании основных (Arg, His, Lys) по сравнению с другими эндоглюканазами пятого семейства, в особенности бактериальными. Соответственно, попытка значительного увеличения количества основных а.о. на поверхности ЭГ2 путем эмпирического сайт-направленного мутагенеза может сдвинуть pH-оптимум фермента из кислой области в нейтрально-щелочную.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН и Российского научного фонда (грант № 16-14-00163).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ravindran V.* // J. Appl. Poult. Res. 2013. V. 22. № 3. P. 628.
2. *Осинов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др.* // Катализ в промышленности. 2010. № 5. С. 64.
3. *Соловьёва И.В., Окунев О. Н., Вельков В.В. и др.* // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 172.
4. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M. et al.* // J. Biotechnol. 2010. V. 5. P. 871.
5. <http://www.cazy.org/>
6. *Наумов Д.Г.* // Биохимия. 2011. Т. 76. № 6. С. 764.
7. *Dominguez R., Souchon H., Lascombe M.-B., Alzari P.M.* // J. Mol. Biol. 1996. V. 257. P. 1042.
8. *Davies G.J., Dauter M., Brzozowski M. et al.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 1926.
9. *Van Petegem F., Vandenberghe I., Bhat M.K., Van Beeumen J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 296. № 1. P. 161.
10. *Pereira J.H., Chen Z., McAndrew R.P. et al.* // J. Struct. Biol. 2010. V. 172. P. 372.
11. *Tseng C.W., Ko T.P., Guo R.T. et al.* // Acta Cryst. F. 2011. V. 67. № 10. P. 1189.
12. *Toni M. Lee, Mary F. Farrow, Frances H. Arnold, Stephen L. Mayo* // Protein Sci. 2011. V. 20. № 11. P. 1935.
13. *Koshland D.E.* // Biol. Rev. 1953. V. 28. P. 416.
14. <http://web.expasy.org/findpept/>
15. <http://www.bruker.ru>
16. *McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. et al.* // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 658.
17. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486.
18. *Murshudov G.N., Skubar k P., Lebedev A.A. et al.* // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355.
19. *Afonine P.V., Grosse-Kunstleve R.W., Echols N. et al.* // Acta Cryst. D. 2012. V. 68. P. 352.
20. *Скомаровский А.А.* // Дис. “Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verrucosum*” канд. хим. наук. М.: МГУ, 2006.
21. <https://www.pymol.org>