

УДК 577.150.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЛЮКОАМИЛАЗ РОДА ASPERGILLUS

О.М. Кожокина¹, Т.А. Ковалева²¹ГОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Росздрава²ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет» Воронеж, Россия

При использовании программы Gene Bee на базе результатов секвенирования проведено сравнение аминокислотных последовательностей субъединиц глюкоамилаз рода *Aspergillus*. Получены сведения о степени гомологичности, константных областях, структурной вариабельности их полипептидных цепей.

Ключевые слова: глюкоамилаза, аминокислотная последовательность, гомологичность, структурная вариабельность, константная область

Повышенный интерес к глюкоамилазе обусловлен широким применением данного фермента в медицине, пищевой и легкой промышленности в качестве эффективного биокатализатора. Корректное исследование механизма действия фермента подразумевает наряду с определением функциональных свойств проведение структурного анализа. Сравнение первичных структур глюкоамилаз из различных источников позволит идентифицировать аминокислотные остатки, играющие важнейшую роль в функционировании данных ферментов.

Для выявления константных областей аминокислотных последовательностей ферментов узкой группы с помощью программы Gene Bee (<http://www.genebee.msu.ru/genebee.html>) осуществлено сравнение сиквенсов субъединиц глюкоамилаз из микромицетов рода *Aspergillus*: *Asp. niger*, *Asp. awamori* X 100, *Asp. awamori* var. *kawachi*, *Asp. shirousami*, *Asp. oryzae*, размещенных в INTERNET National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) и Protein Brookhaven Database (<http://www.rcsb.org>). Обнаружено, что первичные структуры рассматриваемых белковых молекул гомологичны друг другу на 86,1%. Сигнальные пептиды в высокой степени схожи и состоят из 24 аминокис-

лотных звеньев. Однако данный фрагмент пробелка из *Asp. oryzae* характеризуется наличием двух дополнительных остатков Val-2 и Val-20. Показано, что N-концевыми аминокислотами полипептидных цепей являются остатки Ala и Thr; C-концевыми - Trp и Arg. Наиболее протяженные, абсолютно идентичные для анализируемых сиквенсов фрагменты, их позиции в первичной структуре и наличие функционально значимых аминокислотных остатков представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что в состав константных областей полипептидных цепей глюкоамилаз рода *Aspergillus* входят остатки Asp и Glu, карбоксильные группы которых участвуют в разрыве гликозидных связей в молекуле крахмала в процессе катализа, и остаток Trp, выполняющий субстрат-связывающую функцию [1, 3].

Сопоставление первичных структур глюкоамилаз *Asp. species* показало, что частота замен остатков на протяжении полипептидных цепей отличается высокой вариабельностью. В результате сравнения сиквенсов этих ферментов удалось выявить несущественные для проявления структурно-функциональных свойств белков позиции аминокислот, обнаружив высокую частоту замен звеньев в данных местах полипептидных цепей (табл. 2).

Более эволюционно значимыми событиями являются вставки и пропуски отдельных остатков или целых групп аминокислот. Так, полипептидная цепь субъединицы глюкоамилазы из *Asp. oryzae*, наряду с приобретением дополнительного остатка Gly-3 утратила три довольно протяженных фрагмента, а также Ser-584, в результате чего существенно укоротилась и состоит из 586 аминокислотных звеньев. Анализ имеющихся данных [2, 4-6] показал, что делеции затрагивают только О-гликози-

лированный домен белковой глобулы и не отражаются на функциональных свойствах фермента. Обнаружено, что в аминокислотных последовательностях субъединиц глюкоамилаз из *Asp. oryzae*, *Asp. awamori* X 100, *Asp. awamori* var. *kawachi*, *Asp. shirousami* имеет место пропуск Ala-102 в каталитическом домене. В результате делеции остатка Ala-102, несущественного для проявления ферментативной активности, их полипептидные цепи включают 615 мономерных звеньев.

Таблица 1

Консервативные области полипептидных цепей глюкоамилаз рода *Aspergillus*

Фрагмент полипептидной цепи	Позиция фрагмента	Наличие функционально важного остатка
PDYFYTWTRDSG	46-57 ^{1,2} , 47-58 ³	D-55 ^{1,2} , D-56 ³
GLGEPKFNVDETA	103-115 ^{1,3} , 102-114 ²	-
WGRPQRDGPALRATAMI	120-136 ^{1,3} , 119-135 ²	W-120 ^{1,3} , W-119 ²
VRNDLSYVAQYW	159-170 ^{1,3} , 158-169 ²	-
PLWEEV	176-181 ^{1,3} , 175-180 ²	E-179 ^{1,3} , E-178 ²
TLAAAEQLYDALYQWDK	321-337 ^{1,3} , 320-336 ²	-
SARDLTWSYAALLTANNRRN	411-430 ¹ , 410-429 ²	-

Примечание: ¹ – *Aspergillus niger*; ² – *Aspergillus awamori* X 100, *Aspergillus awamori* var. *kawachi*, *Aspergillus shirousami*; ³ – *Aspergillus oryzae*

Таблица 2

Структурная вариабельность полипептидных цепей субъединиц глюкоамилаз рода *Aspergillus*

Продуцент глюкоамилазы	Позиции остатков с высокой частотой замен
<i>Aspergillus niger</i>	60, 73, 80, 84, 88, 91, 130, 150, 219, 232, 240, 246, 261, 310, 320, 343, 357, 375, 399, 403, 409, 410, 436, 446, 456, 482, 487, 496, 504, 551, 583
<i>Aspergillus awamori</i> X 100, <i>Aspergillus awamori</i> var. <i>kawachi</i> , <i>Aspergillus shirousami</i>	60, 73, 80, 84, 88, 91, 129, 149, 218, 231, 239, 245, 260, 309, 319, 342, 356, 374, 398, 402, 408, 409, 435, 445, 455, 481, 486, 495, 503, 550, 582
<i>Aspergillus oryzae</i>	61, 74, 81, 85, 89, 92, 130, 150, 219, 232, 240, 246, 261, 310, 343, 357, 375, 399, 403, 409, 410, 436, 446, 456, 483, 529, 551, 576

На основе данных литературы [2, 4-6] можно заключить, что остатки, находящиеся во внутренней части глобулы, обычно мало подвержены изменениям, и все различия между гомологичными белками касаются поверхности молекул. В тех случаях, когда пространственная организация белка еще неизвестна, подобная структурная вариабельность может дать относительно достоверную информацию о локализации каждого конкретного остатка в макромолекуле.

Известно, что дисульфидные мостики обнаруживают тенденцию сохраняться

в процессе эволюции, поэтому они присутствуют в одних и тех же участках третичной структуры родственных белков [2, 4-6].

Установлено, что 8 остатков Cys, участвующих в образовании дисульфидных мостиков, в анализируемых сиквенсах глюкоамилаз занимают жестко фиксированные позиции и входят в состав абсолютно идентичных участков цепи. Остатки Cys-319 и Cys-320 в полипептидных цепях глюкоамилаз из *Asp. niger*, *Asp. awamori* X 100, *Asp. shirousami* представлены свобод-

ными SH-группами и характеризуются высокой частотой замен.

В результате проведенного анализа аминокислотных последовательностей глюкоамилаз рода *Aspergillus* установлена высокая степень гомологичности для ферментов из *Asp. awamori* X 100 и *Asp. shigousami*; самые существенные отличия обнаружены между амилазами из *Asp. awamori* X 100 и *Asp. oryzae*. Выявлено, что в состав константных областей полипептидных цепей глюкоамилаз *Aspergillus* species входят остатки Asp, Glu и Trp, что позволяет подтвердить их участие в осуществлении катализа реакции гидролиза крахмала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов. – Киев: Наук. думка, 1987. – 192 с.
2. Кантор Ч. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1984. – Т. 1. – 336 с.
3. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. – Тбилиси: Мецниереба, 1984. – 154 с.
4. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. – М.: Наука, 1992. – 358 с.
5. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. – Минск: Наука и техника, 1989. – 240 с.
6. Шульц Г. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 360 с.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF AMINO ACID SEQUENCES OF GLUCOAMYLASES ASPERGILLUS SPECIES

О.М. Kozhokina¹, Т.А. Kovaleva²

¹*Voronezh State Medical Academy*

²*Voronezh State University*

The comparison of amino acid consequences of subunits of glucoamylases *Aspergillus* species has been performed with use of programme Cene Bee on base of the results. The data about degree of homology, about constant regions and structural variability of polypeptide chains have been obtained.

Keywords: glucoamilase, amino acid sequence, homology, structural variability, constant regions