

УДК 575.83

ЗАПАСНЫЕ ГЛОБУЛИНЫ СЕМЯН: ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ПЕРВИЧНОЙ И ВЫСШИХ СТРУКТУР

© 2015 А.С. Рудакова¹, А.М. Кердиварэ¹,
К.А. Вилсон², А.Д. Шутов^{1*}

¹ Государственный университет Молдовы, Молдова,
MD-2009 Кишинев, ул. Матеевича, 60; факс: (37)322-244248,
электронная почта: rud-as@mail.ru, alacherdivara@mail.ru,
shutovandrei@yahoo.com

² Университет штата Нью-Йорк в Бингемтоне, США,
13902-6000, Бингемтон, Нью-Йорк; факс: (607)777-6521,
электронная почта: kwilson@binghamton.edu

Поступила в реакцию 21.04.15
После доработки 11.06.15

Легумин и вицилин, двудоменные запасные глобулины семян, близки на уровне первичной и высших структур доменов однодоменным джерминам растений, а также доменам двудоменных и однодоменных оксалатдекарбоксилаз бактерий. Установлены независимые пути эволюции запасных глобулинов и джерминов, восходящие, соответственно, к двудоменным и однодоменным оксалатдекарбоксилазам бактерий. Показано, что первичная, третичная и четвертичная структуры легуминов отражают наиболее древние признаки, характерные для общего предшественника запасных глобулинов. В ходе эволюции у запасных глобулинов сформировался специфический механизм контроля их деградации. Установлено, что в прорастающих семенах и *in vitro* ограниченный протеолиз легумина сои и вицилина фасоли приводит к закономерным их изменениям, инициирующим глубокое расщепление молекулы запасного глобулина по поодиочному (one-by-one) механизму. Показано также, что ограниченный протеолиз легумина сои ослабляет межсубъединичные взаимодействия в его молекуле. На основе этих данных предложена гипотеза, согласно которой способность легумина сои к поодиочному протеолизу приобретает в результате его диссоциации, обнажающей маскированные в олигомере пептидные связи, потенциально чувствительные к протеолитической атаке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: запасные глобулины семян, джермины, оксалатдекарбоксилазы, третичная структура, эволюция, протеолиз.

Легумин и вицилин являются наиболее характерными для сперматофитов запасными белками семян [1, 2]. Установлена гомология легумина и вицилина [3–5]. Субъединицы легумина и вицилина образованы *N*- и *C*-концевыми доменами, которые гомологичны между собой, что свидетельствует о происхождении обоих доменов от общего однодоменного предшественника. Ранее предполагалось, что структуру такого предшественника могут отражать семейства

однодоменных джерминов растений и сферулинов *Amoebozoa* [6], сходных с доменами запасных глобулинов (в т.ч. на уровне третичных структур [7]).

Сходство филогенетически столь разнородных белков, как запасные глобулины семян и сферулины, стимулировало широкий поиск эволюционно и/или структурно родственных белков, завершившийся обнаружением суперсемейства купинов [8], в состав которого входят десятки тысяч разнообразных белков эукариот и прокариот. Главный признак принадлежности того или иного белка к суперсемейству купинов – присутствие в его молекуле структурного модуля, образующего β -баррель из антипараллельных β -тяжей *BCDEFGHI* (рис. 1, *a*). В формировании купинового β -барреля участвуют характерные для джерминов и сферулинов, но в раз-

Принятые сокращения: ОД – оксалатдекарбоксилаза, ASA – доступная растворителю площадь поверхности аминокислотного остатка в структуре белка (\AA^2), RMSD – среднеквадратичное отклонение C^α -атомов аминокислотных остатков белков при пространственном совмещении их структур (\AA).

* Адресат для корреспонденции.

личной степени вырожденные у других купинов [8] мотивы аминокислотных последовательностей $Gx_5HxHx_{3,4}Ex_6G$ (тяжи *CDE*) и $Gx_5PxGx_2Hx_3N$ (тяжи *FGH*). Вероятно, источником сходства третичных структур, по крайней мере части семейств купинов, объединяемых в суперсемейство, является конвергентная эволюция [10].

Сходство первичных и высших структур запасных глобулинов и джерминов выходит далеко за пределы собственно β -барреля, который дополнен β -тяжами *A* и *J* и соединен с группой α -спиралей (рис. 1, *а*). Аналогичным образом сформированы молекулы двудоменных оксалацетатдегидрогеназ (ОД) бактерий (рис. 1, *б*), последовательности которых гомологичны запасным глобулинам [10, 11]. Следовательно, двудоменная структура запасных глобулинов семян может быть унаследована не от джерминоподобного предшественника, претерпевшего дупликацию, а напрямую от двудоменных бактериальных ОД [10, 11]. Ряд косвенных признаков свидетельствует в пользу такого предположения (в структуре джерминов отсутствуют дополнительные β -тяжи *Z*, *A'* и *J'*, характерные для запасных глобулинов и ОД) (рис. 1).

Более весомым свидетельством в пользу этой гипотезы является обнаружение двудоменного ОД-подобного белка зеленой водоросли как промежуточного эволюционного звена между ОД бактерий и легумино- и вицилиноподобными белками плауна и папоротника [12]. Последние являются, по-видимому, ближайшими предшественниками запасных глобулинов семян. Об этом, в частности, свидетельствует идентичность экзон-интронной структуры (совпадение числа, положения и фазы интронов) генов, кодирующих вицилины и легумины и, соответственно, вицилиноподобные и легуминоподобные белки плауна [12].

В настоящей работе впервые получено прямое свидетельство существования двух независимых ветвей эволюции запасных глобулинов семян и джерминов, восходящих, соответственно, к двудоменным и однодоменным ОД. Суммированная в недавних обзорах [10, 12] информация о запасных глобулинах дополнена новыми сведениями о последовательности формирования структур легумина и вицилина, а также о возможном механизме контроля глубокой дегградации легумина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа использовали следующие программы: BLAST для поиска гомологичных аминокислотных последовательностей, ClustalW2 для их выравнивания и TREECON [13] для эволюционного анализа. Программу DeepView/Swiss-Pdb Viewer использовали для анализа третичных структур белков, структурного выравнивания их последовательностей и построения ленточных диаграмм. Сходство третичных и четвертичных структур белков оценивали по результатам их пространственного совмещения. Принимали только те из предоставляемых программой вариантов, при которых C^α -атомы аминокислотных остатков совмещены со среднеквадратичным отклонением (RMSD), не превышающим 1,6 Å. В качестве критериев сходства первичных, третичных и четвертичных структур олигомерных белков принимали, соответственно, число идентичных аминокислотных остатков в структурно выровненных последовательностях субъединиц и число пространственно совмещенных C^α -атомов в отдельных субъединицах и их димерах. Доступную растворителю площадь поверхности аминокислотного остатка в структуре белка (ASA), выраженную в Å², рассчитывали с помощью программы <http://cib.ct.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>. Относительную величину ASA выражали в % от доступности остатка в пентапептиде GGXGG.

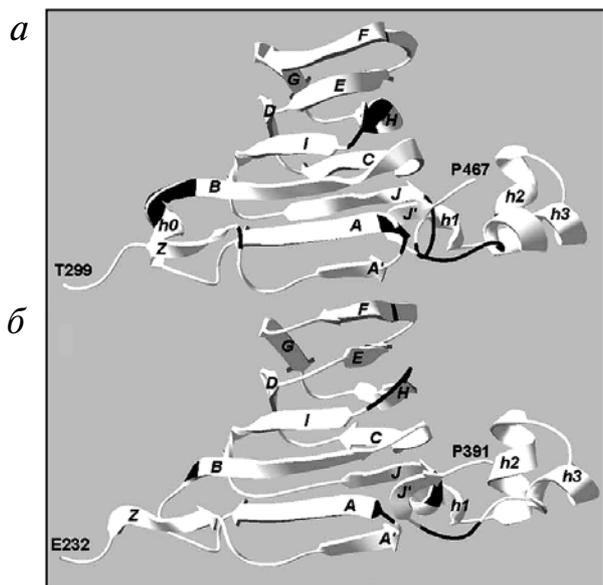


Рис. 1. Ленточные диаграммы пространственно совмещенных структур C-концевых доменов легумина 1fxz *Glycine max* (*а*) и ОД 2vqa цианобактерии *Synechocystis* sp. (*б*), показанные порознь. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) при совмещении 150 C^α -атомов последовательностей доменов составило 1,08 Å. Черные участки диаграмм соответствуют C^α -атомам, не совпадающим по положению в совмещенных структурах. В частности, это дополнительная α -спираль *h0* между β -тяжами *A* и *B*, характерная для доменов запасных глобулинов семян [9]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Независимые пути эволюции запасных глобулинов семян и джерминов. Для получения статистически достоверных результатов анализа эволюционных взаимоотношений между запасными глобулинами и джерминами мы руководствовались ранее описанной стратегией [10, 14], основанной на принципах подбора аминокислотных последовательностей и наиболее консервативных их участков, а также выбора последовательности, пригодной к использованию в качестве корневой (outgroup sequence).

В составе обширного и весьма консервативного семейства ОД бактерий обнаружена группа двудоменных ОД протеобактерий и цианобактерий, в наибольшей степени сходных с двудоменными запасными глобулинами [12], а также группа однодоменных ОД актинобактерии *Mycobacterium abscessus*, полные последовательности которых далеко за пределами домена гомологичны однодоменным сферулинам Amoebozoa [10].

Высокий уровень сходства *N*- и *C*-концевых доменов двудоменных ОД бактерий свидетельствует об их происхождении из более древних однодоменных ОД. Следовательно, для анализа эволюционных путей запасных глобулинов и джерминов/сферулинов в качестве корневой может быть использована аминокислотная последовательность домена из упомянутой группы однодоменных ОД *M. abscessus* в сопоставлении с доменами однодоменных белков и либо с *N*-концевыми, либо с *C*-концевыми гомологичными доменами двудоменных белков. Для анализа использованы *C*-концевые домены двудоменных белков, наиболее консервативные в первичных структурах запасных глобулинов.

Как и предполагалось ранее [10, 12], запасные глобулины и джермины образуют две независимые эволюционные ветви, исходящие из однодоменной ОД (рис. 2). Эволюция джерминов развивалась по классическому дивергентному сценарию (Bacteria, Amoebozoa, Stramenopiles, Chlorophyta, Bryophyta, Lycoperidophyta, Pinophyta, Magnoliophyta), тогда как на эволюционной ветви запасных глобулинов отсутствуют двудоменные белки низших эукариот как промежуточные звенья между бактериальными ОД и ОД-подобными белками зеленой водоросли *Coccomyxa subellipsoidea*. Возможно, последние напрямую унаследованы от бактериальных ОД с участием механизма горизонтального переноса генов [12]. В этой связи отметим близкое родство двудоменных ОД-подобных белков Metazoa и бактериальных ОД при отсутствии известных промежуточных эволюционных звеньев между ними (данные не представлены).

В геномах *Selaginella moellendorffii* (плаун) и *Amborella trichopoda* (базальная группа Magnoliophyta) присутствуют гены, кодирующие все пять типов белков, гомологичных вицилину и легумину: вицилиноподобные белки, легуминоподобные белки групп *a* и *b*, джермины и джерминоподобные белки (рис. 2).

Белки *S. moellendorffii* (вицилиноподобные и легуминоподобные группы *b*) являются предшественниками не только запасных глобулинов семян, но и двух обширных консервативных семейств незапасных вицилино- и легуминоподобных белков сперматофитов (рис. 2). За редким исключением [2, 14] функции этих белков остаются неизвестными.

Вицилиноподобный белок саа91187 специфично синтезируется в созревающих спорах папоротника *Matteuccia struthiopteris* [15]. Показано сходство механизмов регуляции экспрессии его гена и генов запасных глобулинов семян [16]. Вероятно, вицилиноподобный белок *M. struthiopteris* является примитивным запасным белком [17]. Возможно, примитивными запасными белками являются и вицилиноподобные, и легуминоподобные белки *S. moellendorffii* группы *a*, образующие общий кластер с легуминами (рис. 2).

Субъединицы запасных глобулинов и ОД соединены в тримеры, образованные в результате взаимодействий между *N*- и *C*-концевыми доменами соседствующих в тримерах субъединиц. В ходе эволюции легуминов сформировался междоменный Asp-специфичный сайт процессинга, посттрансляционное расщепление по которому приводит к образованию α - и β -цепей субъединиц (*N*- и *C*-концевых доменов соответственно).

Основанная на анализе первичных структур гомологичных белков растений и бактерий гипотеза о происхождении запасных глобулинов семян из двудоменных бактериальных ОД (рис. 2) находит подтверждение при пространственном совмещении не только вторичных и третичных структур их доменов (рис. 1) и субъединиц, но и четвертичных структур (см. ниже).

Первичная, третичная и четвертичная структуры легумина отражают наиболее древние признаки эволюционного предшественника запасных глобулинов. Дивергенция эволюционной ветви запасных глобулинов на независимые кластеры легумина и вицилина наблюдается уже на уровне плауна (рис. 2). Структуру их общего предшественника, возможно, отражает белок плауна efj19431, занимающий промежуточное положение между ОД-подобным белком зеленой водоросли и кластерами легумина и вицилина при эволюционном анализе суммы последовательностей *N*- и *C*-концевых доменов двудоменных белков [12]. При этом последовательность *C*-кон-

цевого домена этого белка достоверно легуминоподобна (рис. 2). Более того, легуминоподобна и большая часть последовательности С-концевого домена вицилиноподобного белка папоротника *caa91187* [14, 15]. Возможно, по сравнению с вицилинами первичные (и высшие) структуры легуминов отражают более древние признаки.

В соответствии с результатами эволюционного анализа (рис. 2) ближайшим общим предшественником легуминов и вицилинов с известной третичной и четвертичной структурами является бактериальная ОД 2vqa. Поэтому струк-

тура ОД 2vqa может быть использована в качестве корневой для установления относительного уровня древности первичной и высших структур легуминов и вицилинов. Согласно результатам пространственного совмещения третичных структур субъединиц легумины существенно ближе к ОД 2vqa, чем вицилины (рис. 3, белые столбцы). Относительная древность не только третичных, но и первичных структур легуминов обнаруживается по результатам структурного выравнивания аминокислотных последовательностей субъединиц ОД 2vqa и субъединиц запасных глобулинов (рис. 3, черные столбцы).

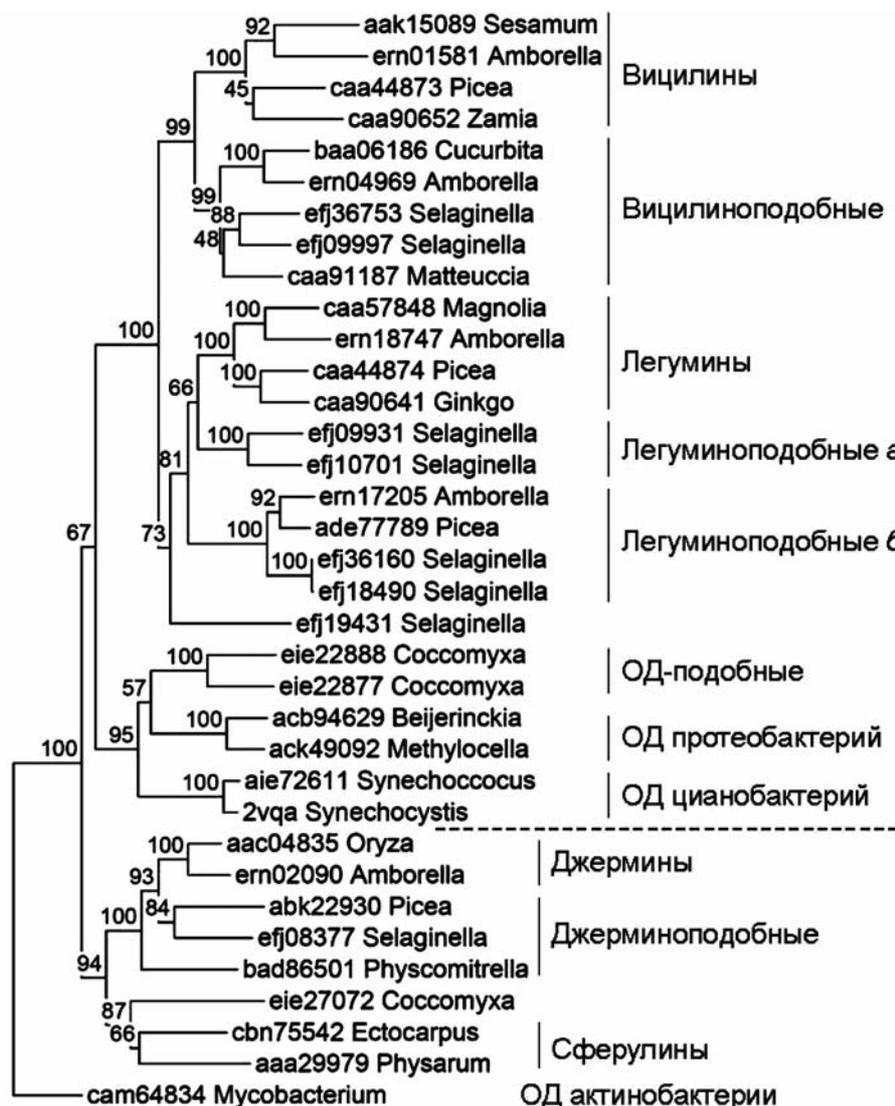


Рис. 2. Независимые пути эволюции запасных глобулинов семян и джерминов. Области последовательностей, использованные для анализа, соответствуют С-концевым доменам двудоменных белков и домену джерминов/сферулинов (172 позиции множественного выравнивания). Цифры над ветвями отражают статистическую поддержку кластеров (% из 1000 репликаций). Штриховой линией разделены кластеры однодоменных и двудоменных белков. В качестве корневой использована последовательность однодоменной ОД *cam64834 Mycobacterium abscessus*

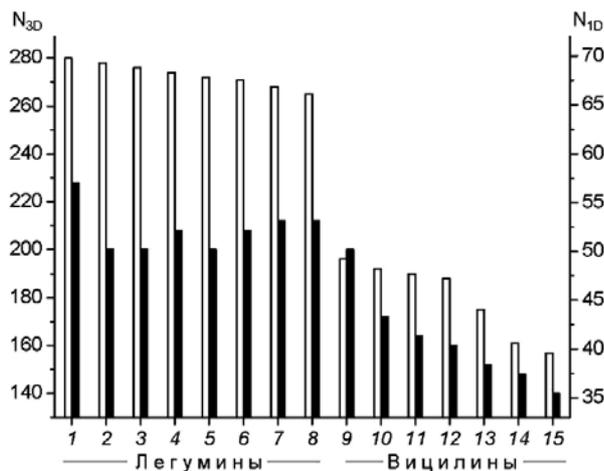


Рис. 3. Сопоставление третичных (белые столбцы) и первичных (черные столбцы) структур субъединиц запасных глобулинов и ОД 2vqa цианобактерии *Synechocystis* sp. N_{3D} – число C^α-атомов аминокислотных остатков, совпадающих по положению при пространственном совмещении (RMSD от 1,3 до 1,6 Å) третичных структур субъединиц. N_{1D} – число идентичных аминокислотных остатков в структурно выровненных последовательностях субъединиц. Легумины – 1fxz (1) и 3d5h (5) *Glycine max*; 3ksc (2) *Pisum sativum*; 2e9q (3) *Cucurbita maxima*; 3fz3 (4) *Prunus dulcis*; 3qac (6) *Amaranthus hypochondriacus*; 3c3v (7) *Arachis hypogaea*; 3kgl (8) *Brassica napus*. Вицилины – 4lej (9) *Pinus koraiensis*; 2cv6 (10) *Vigna radiata*; 1ipk (11) и 1uik (13) *Glycine max*; 2cau (12) *Canavalia ensiformis*; 2phl (14) *Phaseolus vulgaris*; 3smh (15) *Arachis hypogaea*

При пространственном совмещении структур тримеров ОД 2vqa и запасных глобулинов удовлетворительно (RMSD \geq 1,6 Å) совпадают по положению C^α-атомы только двух (А и В) из трех субъединиц. Взаимоотношения структур ОД 2vqa, легумина 3fz3 и вицилина 1uik иллюстрируются показанными на рис. 4 результатами совмещения их димеров в составе тримеров. Легумин и ОД близки на уровне третичных структур N- и C-концевых доменов, субъединиц и их димеров, тогда как структурное сходство ОД и вицилина обнаруживается едва ли не исключительно на уровне их C-концевых доменов.

Приведенные результаты свидетельствуют об относительной древности первичной, третичной и четвертичной структур легуминов, тогда как у вицилинов древние признаки сохранились преимущественно на уровне их C-концевых доменов.

Контроль деградации запасных глобулинов в прорастающих семенах. Существенное различие между легумино- и вицилиноподобными белками *S. moellendorffii* и запасными глобулинами сперматофитов – появление у последних удлиненных неструктурированных участков в соста-

ве доменов [12]: петли между β-тяжами E и F и между β-баррелем и α-спиралями в N-концевом домене легуминов, петли EF в C-концевом домене вицилинов. Эти петли, а также N-концевое удлинение у вицилинов конвицилинового типа и удлиненная связка между доменами легумина и вицилина образуют поверхностные гидрофильные слои в структуре запасных глобулинов [3, 4], чувствительные к протеолитической атаке [18–20]. Показателем потенциальной чувстви-

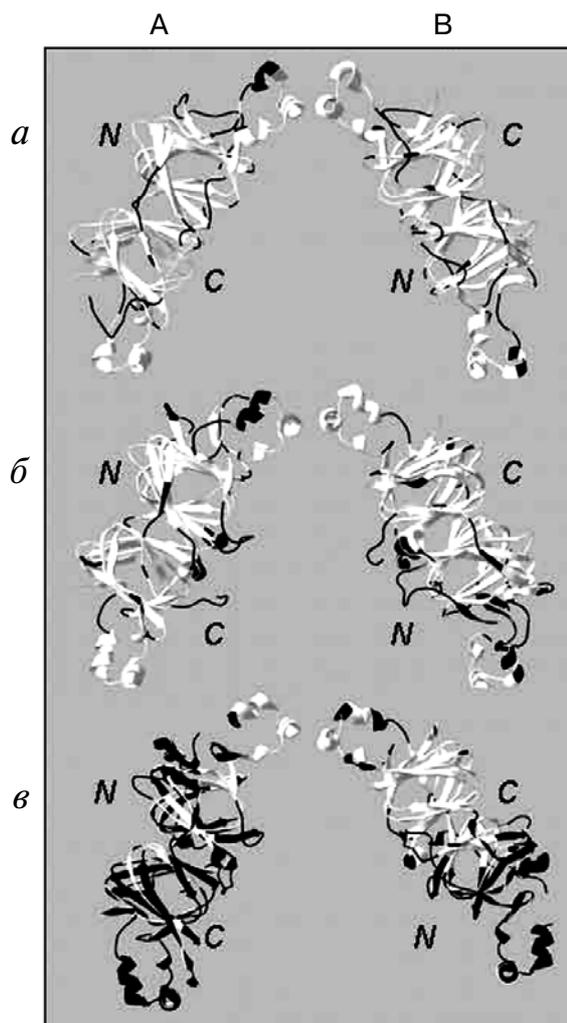


Рис. 4. Ленточные диаграммы пространственно совмещенных структур субъединиц А и В в составе тримеров ОД 2vqa цианобактерии *Synechocystis* sp. (а), легумина 3fz3 *Prunus dulcis* (б) и вицилина 1uik *Glycine max* (в), показанные порознь. Для наглядности структуры субъединиц А и В показаны на рисунке раздвинутыми по горизонтали, структуры субъединиц С не приведены. N и C – N- и C-концевые домены соответственно. Черные участки диаграмм соответствуют C^α-атомам, не совпадающим по положению в совмещенных структурах ОД/легумин (а, б) и ОД/вицилин (в)

тельности к протеолизу областей в структуре белка является присутствие в них аминокислотных остатков с повышенной доступностью растворителю [12, 21].

Протеолитическая деградация запасных глобулинов *in vitro* и в прорастающих семенах протекает в два этапа [12]. На первом этапе наблюдается либо преимущественно, либо исключительно ограниченный протеолиз, заключающийся в отщеплении части из упомянутых выше чувствительных областей молекулы. После завершения ограниченного протеолиза образуется относительно стабильный высокомолекулярный продукт, далее расщепляющийся исключительно по поодиночному (*one-by-one* [22]) механизму. Скорость поодиночного протеолиза лимитируется расщеплением первой пептидной связи в каждой молекуле белка [22]. Последующие расщепления в этой молекуле происходят с возрастающей скоростью, поэтому процесс протекает как реакция псевдопервого порядка [23, 24].

В зависимости от плотности упаковки молекулы нативный запасной глобулин может быть чувствителен или нечувствителен к расщеплению по поодиночному механизму [12]. В первом случае ограниченный и поодиночный протеолиз протекают параллельно, независимо друг от друга (вицилин сои [21, 25] и легумин овса [12]). Во втором случае поодиночный протеолиз начинается лишь после завершения ограниченного протеолиза (вицилин фасоли [21], легутины сои [26] и тыквы [27]). Таким образом, в последних случаях ограниченный протеолиз приводит к появлению в структуре запасного глобулина пептидных связей, расщепление которых инициирует глубокую деградацию его молекулы по поодиночному механизму.

Константа скорости поодиночного протеолиза белка зависит от конформационного состояния его молекулы [28]. По-видимому, способность упомянутых выше запасных глобулинов [21, 26, 27] к поодиночному протеолизу в конечном итоге приобретает в связи с закономерными изменениями третичной структуры субъединиц в ходе ограниченного протеолиза. Однако анализ последовательных реакций ограниченного протеолиза глицинина (легумина сои) папаином [26] позволяет предположить, что способность к поодиночному протеолизу этого белка изначально приобретает в результате изменений не столько третичной, сколько четвертичной структуры его молекулы.

Ограниченный протеолиз глицинина папаином завершается отщеплением протяженной C-концевой последовательности α -цепей (*N*-концевого домена), включающей не только бес-

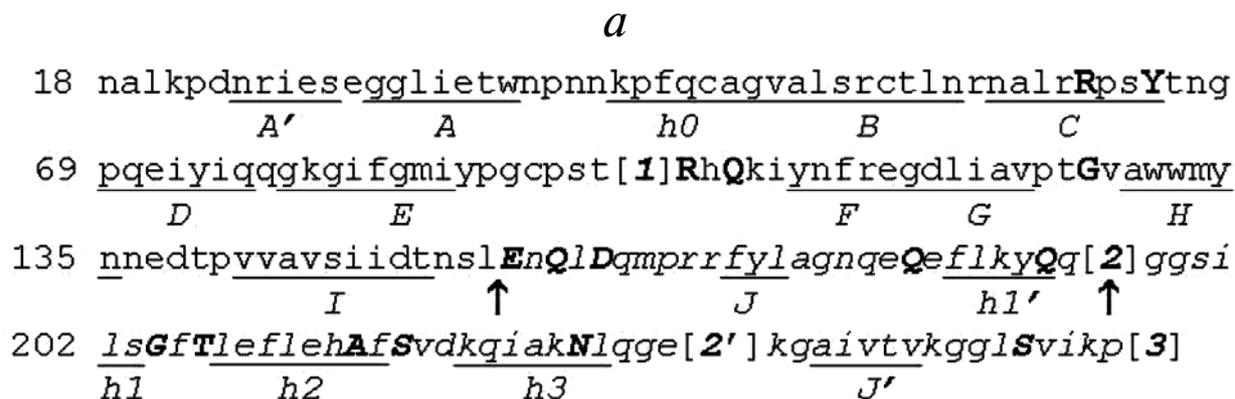
структурную междоменную связку, но и прилегающую область последовательности, образующую в нативном белке группу α -спиралей [26] (рис. 5). От трети до половины водородных связей, ответственных за взаимодействие между субъединицами А и В в гомотримерах глицинина 1fxz и 2d5h, приходится на долю связей, образованных с участием этих спиралей [4, 26].

Таким образом, в тримерах глицинина-П (конечного продукта ограниченного протеолиза папаином) взаимодействия между субъединицами ослаблены. Хотя способность глицинина-П к необратимой диссоциации не была обнаружена экспериментально [26], это не исключает возможность существования обратимой диссоциации, при которой равновесие диссоциации смещено в сторону ассоциированной формы. В результате диссоциации глицинина-П в структуре его субъединиц обнажаются пептидные связи, потенциально чувствительные к протеолитической атаке, которые маскированы в нативном глициине. Так, доступная растворителю площадь поверхности субъединиц недиссоциированного глицинина-П 1fxz (сумма величин ASA) после его диссоциации увеличивается в 1,2 раза (с 12 500 до 15 400 Å²). При диссоциации глицинина-П 1fxz в наибольшей степени увеличивается доступность растворителю аминокислотных остатков в области петли между тяжами *I* и *J* α -цепей (ASA остатка Leu152, соответствующего субстратной специфичности папаина [29], возрастает с 40 до 61%).

Предполагаемое расщепление пептидной связи Leu152–Glu153 в области петли *IJ* удаляет дополнительную C-концевую последовательность α -цепей (рис. 5). При этом удаляется консервативный остаток Phe163, во всех известных структурах легуминов участвующий в формировании и стабилизации тримеров субъединиц [9], а также дополнительный ряд аминокислотных остатков, образующих межсубъединичные водородные связи в нативном глициине (рис. 5).

В описанном гипотетическом сценарии поодиночного протеолиза глицинина-П диссоциированная молекула субстрата немедленно после ее появления удаляется из реакционной смеси. В этом случае скорость поодиночного протеолиза глицинина-П определяется концентрацией диссоциированного субстрата.

Купиновый β -баррель, в соединении с группой α -спиралей являющийся базальным элементом структуры бактериальных ОД, послужил основой для независимого формирования в ходе эволюции гомологичных структур субъединиц запасных глобулинов семян и джерминов растений. Дивергенция эволюционной ветви запас-



b

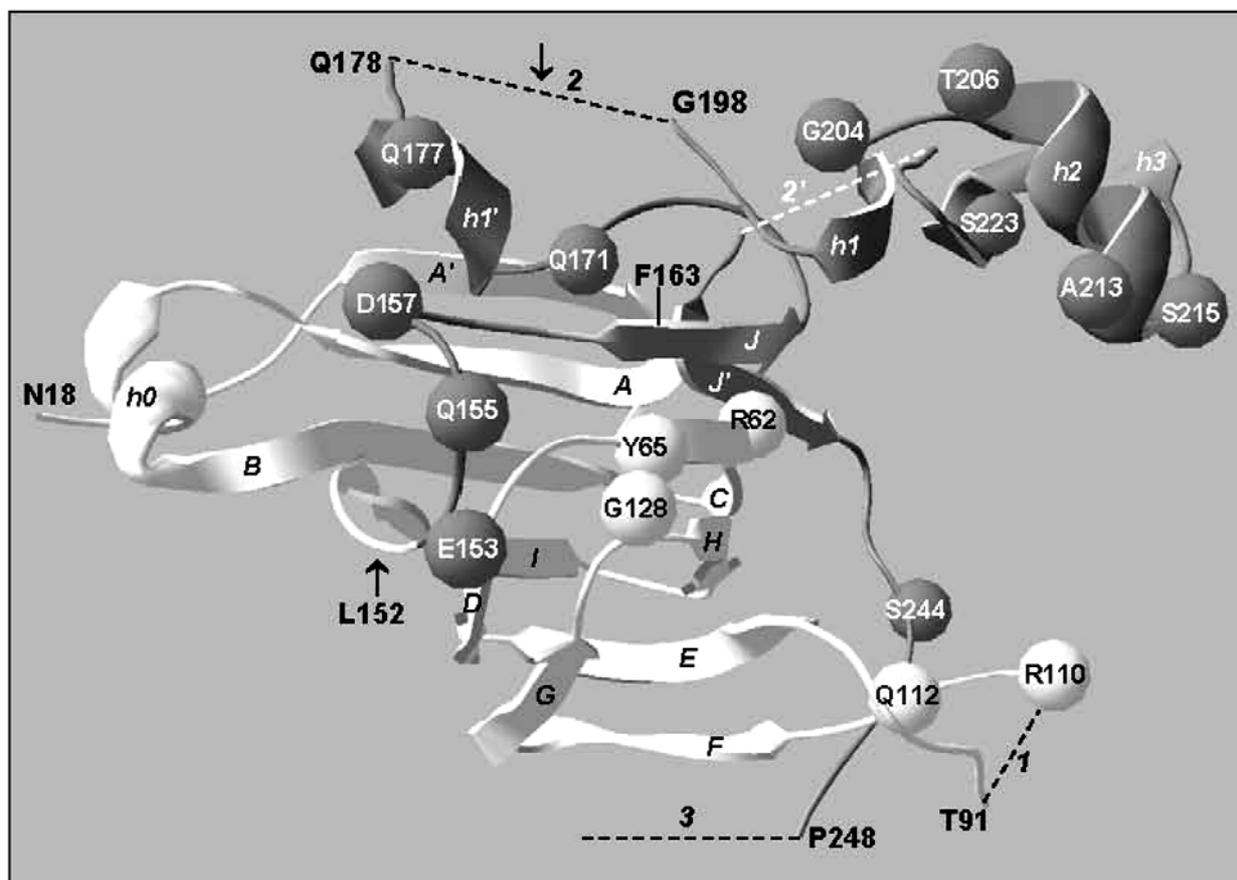


Рис. 5. Глицинин сои 1fxz: структурно организованные участки последовательности α -цепи (*a*) и ленточная диаграмма ее третичной структуры (*b*). Аминокислотные остатки, участвующие в формировании водородных связей между α -цепью субъединицы A и β -цепью субъединицы B в гомотримере глицинина [4], показаны прописными буквами (*a*) или сферами (*b*); Gln155 и Ser244 участвуют в образовании нескольких межсубъединичных связей [4]. В квадратных скобках (*a*) или штриховыми линиями (*b*) показано положение характерных для легуминов бесструктурных участков α -цепи: петли между тяжами E и F (1), петли между тяжем J (и α -спиралью h1' [12]) и группой C-концевых спиралей (2) и междоменной связи (3). Короткий бесструктурный участок 2' характерен только для глицинина 1fxz [9]. Аминокислотные остатки, выделенные курсивом (*a*) или темными участками диаграммы (*b*), удаляются при формировании глицинина-П (в связи с расщеплением центральной части участка 2 [26]) и вслед за его диссоциацией в результате предполагаемого расщепления пептидной связи Leu152–Glu153

ных глобулинов на независимые кластеры легумина и вицилина произошла на уровне таких сосудистых споровых растений, как плауны и папоротники. По сравнению с вицилинами первичная и третичная структуры легуминов в наибольшей степени отражают древние признаки гипотетического общего предшественника за-

пасных глобулинов. Глубокой деградации глицинина сои в прорастающих семенах и *in vitro* предшествует ограниченный протеолиз, ослабляющий межсубъединичные взаимодействия в его олигомере. Предполагается, что глубокое расщепление глицинина по поодиному механизму инициируется диссоциацией его молекул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Casey, R. (1999) Distribution and some properties of seed globulins, in *Seed proteins* (Shewry, P.R., and Casey, R., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 159–169.
- Dunwell, J.M. (2005) Structure, function, and evolution of vicilin and legumin seed storage proteins, in *Biotechnology of biopolymers – from synthesis to patents* (Steinbuchel, A., and Doi, Y., eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 967–997.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R.J., and Colman, P.M. (1994) Structure of phaseolin in 2.2 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **238**, 748–776.
- Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A.B., Mikami, B., and Utsumi, S. (2001) Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer, *J. Mol. Biol.*, **305**, 291–305.
- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B., and Utsumi, S. (2003) Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7395–7400.
- Baumlein, H., Braun, H., Kakhovskaya, I.A., and Shutov, A.D. (1995) Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi, *J. Mol. Evol.*, **41**, 1070–1075.
- Woo, E.J., Dunwell, J.M., Goodenough, P.W., Marvier, A.C., and Pikersgill, R.W. (2000) Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1036–1040.
- Dunwell, J.M., Culham, A., Carter, C.E., Sosa-Aguirre, C.R., and Goodenough, P.W. (2001) Evolution of functional diversity in the cupin superfamily, *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 740–746.
- Tandang-Silvas, M.R.G., Fukuda, T., Fukuda, C., Prak, K., Cabanos, C., Kimura, A., Itoh, T., Mikami, B., Utsumi, S., and Maruyama, N. (2010) Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1432–1442.
- Shutov, A.D., and Kakhovskaya, I.A. (2011) Evolution of seed storage globulins and cupin superfamily, *Mol. Biol. (Moscow)*, **45**, 529–535.
- Dunwell, J.M., and Gane, P.J. (1998) Microbial relatives of seed storage proteins; conservation of motifs in a functionally diverse superfamily of enzymes, *J. Mol. Evol.*, **46**, 147–154.
- Shutov, A.D., and Wilson, K.A. (2014) Seed storage globulins: their descent from bacterial ancestors and mechanisms of degradation, in *Globulins: biochemistry, production and role in immunity* (Milford, S.D., ed.), Nova Science Publishers, N.Y., pp. 71–104.
- Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment, *Comput. Appl. Biosci.*, **10**, 569–570.
- Shutov, A.D., and Baumlein, H. (1999) *Origin and evolution of seed storage globulins* (Shewry, P.R., and Casey, R., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 543–561.
- Shutov, A.D., Braun, H., Chesnokov, Yu.V., and Baumlein, H. (1998) A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins, *Eur. J. Biochem.*, **252**, 79–89.
- Schallau, A., Kakhovskaya, I., Tewes, A., Czihal, A., Tiedemann, J., Mohr, M., Grosse, I., Manteuffel, R., and Baumlein, H. (2008) Phylogenetic footprints in fern spore- and seed-specific gene promoters, *Plant J.*, **53**, 414–424.
- Kakhovskaya, I.A., Rudakova, A.S., and Manteuffel, R. (2003) Legumin-like and vicilin-like proteins from spores of the fern *Matteuccia struthiopteris*, *J. Plant Physiol.*, **160**, 583–588.
- Shutov, A.D., Kakhovskaya, I.A., Bastrygina, A.S., Bulmaga, V.P., Horstmann, C., and Muntz, K. (1996) Limited proteolysis of β -conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): structural and evolutionary implications, *Eur. J. Biochem.*, **241**, 221–228.
- Shutov, A.D., Blattner, F.R., Baumlein, H., and Muntz, K. (2003) Storage and mobilization as antagonistic functional constraints of seed storage globulin evolution, *J. Exp. Bot.*, **54**, 1645–1654.
- Tan-Wilson, A.L., and Wilson, K.A. (2012) Mobilization of seed protein reserves, *Physiol. Plant.*, **145**, 140–153.
- Zakharov, A., Carchilan, M., Stepurina, T., Rotari, V., Wilson, K., and Vaintraub, I. (2004) Comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins, *J. Exp. Bot.*, **55**, 2241–2249.
- Rupley, J.A. (1967) Susceptibility to attack by proteolytic enzymes, *Methods Enzymol.*, **11**, 905–917.
- Shutov, A.D., Pineda, J., Senyuk, V.I., Reva, V.A., and Vaintraub, I.A. (1991) Action of trypsin on soybean glycinin. Mixed-type proteolysis and its kinetics; molecular mass of glycinin-T, *Eur. J. Biochem.*, **199**, 539–543.
- Vaintraub, I.A. (1998) Kinetics of co-operative proteolysis, *Nahrung*, **42**, 59–60.
- Shutov, A.D., Rudakova, A.S., Rudakov, S.V., Kakhovskaya, I.A., Schallau, A.A., Wilson, K.A., and Maruyama, N. (2013) Degradation of β -conglycinin β -homotrimer by papain: independent occurrence of limited and extensive proteolyses, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2082–2086.
- Shutov, A., Rudakova, A., Rudakov, S., Kakhovskaya, I., Schallau, A., Maruyama, N., and Wilson, K. (2012) Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: an *in vitro* model, *J. Plant Physiol.*, **169**, 1227–1233.
- Rudakova, A.S., Rudakov, S.V., Kakhovskaya, I.A., and Shutov, A.D. (2014) 11S storage globulin from pumpkin seeds: regularities of proteolysis by papain, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 820–825.
- Vaintraub, I.A., and Morari, D. (2003) Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **57**, 191–201.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157–162.

**SEED STORAGE GLOBULINS:
ORIGIN AND EVOLUTION OF PRIMARY
AND HIGHER ORDER STRUCTURES**

**A. S. Rudakova¹, A. M. Cherdivara¹,
K. A. Wilson², A. D. Shutov^{1*}**

¹ State University of Moldova, ul. Mateevicha 60,
Kishinev MD-2009, Moldova; fax: (37)322-244248,
E-mail: rud-as@mail.ru, alacherdivara@mail.ru,
shutovandrei@yahoo.com

² State University of New York at Binghamton, Binghamton,
NY 13902-6000, USA; fax: (607)777-6521,
E-mail: kwilson@binghamton.edu

Received April 21, 2015

Revision received June 11, 2015

Legumin and vicilin are two-domain seed storage globulins similar in primary and higher order structures of their domains to single-domain plant germins as well as to the domains of two-domain and single-domain bacterial oxalate decarboxylases. Independent evolutionary pathways have been shown for the descent of the storage globulins and germins from two-domain and single-domain bacterial oxalate decarboxylases, respectively. As compared to vicilins, the primary and tertiary structures of legumins were found to most closely reflect the ancient features characteristic of a common precursor of storage globulins. During the evolution of the storage globulins, a mechanism specifically controlling their degradation has formed. It was demonstrated that limited proteolysis of soybean legumin and kidney bean vicilin in germinating seeds and *in vitro* leads to their regular changes, which initiate an extensive cleavage of storage globulin molecules by the one-by-one mechanism. As also shown, limited proteolysis of soybean legumin loosens the intersubunit interactions in its oligomeric molecule. Based on these data, we hypothesize that the deep one-by-one degradation of soybean legumin is triggered by its dissociation, which bares peptide bonds potentially susceptible to proteolytic attack but masked in the oligomer.

Key words: seed storage globulins, germins, oxalate decarboxylases, tertiary structure, evolution, proteolysis