



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.962

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РИБОСОМАЛЬНОГО БЕЛКА L25
ИЗ РИБОСОМ *E. COLI* MRE-600

Винокуров Л. М., Довгас Н. В., Маркова Л. Ф.,
Медникова Т. А., Алахов Ю. Б., Овчинников Ю. А.

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино

Нами разработан новый препаративный метод выделения индивидуальных белков из 70S-рибосом *E. coli* MRE-600*. В развитие данных исследований мы предприняли изучение первичной структуры белка L25, входящего в состав 5S РНК-белкового комплекса [1].

Белок L25 по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия имеет M 11 500—12 000 [2], не содержит остатков цистеина и для него определен следующий аминокислотный состав (молярные %) [3]:

Asp — 8,6; Thr — 2,4; Ser — 2,8; Glu — 11,7; Pro — 4,7; Gly — 6,7;
Ala — 11,6; Val — 8,5; Met — 3,0; Leu — 6,4; Ile — 4,9; Tyr — 3,5;
Phe — 4,0; His — 3,0; Lys — 11,6; Arg — 6,7.

Нами установлено, что N-концевым аминокислотным остатком белка является метионин, а C-концевая последовательность: -Phe-Val-Arg-Ala.

При анализе триптического гидролизата белка L25 методом пептидных карт было обнаружено 22 пятна. После предварительного разделения продуктов триптического гидролиза на сефадексе G-50 и последующего деления полученных фракций на ионообменной смоле аминекс А-5 с помощью БХ и высоковольтного электрофореза на бумаге было выделено 17 пептидов, а также свободные аланин, аргинин и лизин (см. табл. 1).

Для получения перекрывающихся пептидов и реконструкции полипептидной цепи была определена N-концевая последовательность белка автоматическим методом по Эдману, а также проведены расщепление молекулы белка бромцианом и ограниченный триптический гидролиз белка модифицированного по остаткам лизина цитраконовым ангидридом [4].

После расщепления белка бромцианом смесь пептидов была разделена гель-фильтрацией на сефадексе G-50 и при этом выделены три фрагмента СВ-1, СВ-2, СВ-3, а также гомосерин, являющийся продуктом превращения N-концевого остатка метионина. Фрагмент СВ-2 представлял собой дипептид Asp-Hse, входящий в состав триптического пептида Т-9. Опре-

* См. статью Ю. Б. Алахова и соавт. «Препаративный метод разделения белков из 70S-рибосом *E. coli* MRE-600» в следующем номере журнала.

Таблица 1

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg
T-2	Lys-Glu-Gln-Gly-Lys
T-3	Glu-Gln-Gly-Lys
T-4	Gly-Ala-Ser-Arg
T-5	Gly-Ala-Ser-Arg-Arg
T-6	Arg-Leu-Arg
T-7	Leu-Arg
T-8	Ala-Ala-Asn-Lys-Phe-Pro-(Ala ₁ , Ile ₂ , Tyr ₁ , Gly ₂ , Lys ₁)
T-9	Glu-Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-(Lys ₂ , Val ₁ , Met ₂ , Asn ₁ , Glu ₁ , Ala ₁)
T-10	Ala-Glu-Phe-Tyr-Ser-Glu-Val-Leu-Thr-Ile-Val-Val-Asp-(Gly, Lys)
T-11	Glu-Ile-Lys
T-12	Val-Lys
T-13	Ala-Gln-Asp-Val-Gln-Arg-His-Pro-Tyr-(Lys ₂ , Pro ₁)
T-14	Ala-Gln-Asp-Val-Gln-Arg
T-15	Glu-Ile-Lys-Val-Lys
T-16	Leu-Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg-Ala
T-17	Leu-Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg Ala Arg Lys

Таблица 2

Пептид	Аминокислотная последовательность
LT-1	Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg
LT-2	Lys-Glu-Gln-Gly-Lys-Gly-Ala-Ser-Arg
LT-3	Lys-Glu-Gln-Gly-Lys-Gly-Ala-Ser-Arg-Arg
LT-4	Ala-Ala-Asn-Lys-Phe-Pro-Ala-Ile-Ile-Tyr-Gly-Gly-Lys-Glu-Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-Lys-Val-Met-Asn-Met-Gln-Ala-Lys-Ala-Glu-Phe-Tyr-(Ala ₁ , Asx ₂ , Arg ₁ , Glx ₄ , Gly ₁ , Ile ₂ , Leu ₁ , Lys ₃ , Ser ₁ , Thr ₁ , Val ₅)
LT-5	His-Pro-Tyr-Lys-Pro-Lys-Leu-Gln-His-(Ile, Asp, Phe, Val, Arg, Ala)

Таблица 3

Пептид	Аминокислотная последовательность
BS-1	Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg-Lys-Glu-(Ala ₄ , Arg ₂ , Asn ₁ , Gln ₁ , Gly ₂ , Ile ₂ , Leu ₁ , Lys ₂ , Ser ₁ , Phe ₁ , Pro ₁ , Tyr ₁)
BS-2	Gly-Gly-Lys-Glu-Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-(Lys, Val, Met)
BS-4	Ser-Glu-Val-Leu-Thr-Ile-Val-(Ala ₁ , Arg ₁ , Asp ₂ , Gln ₂ , Glu ₁ , Gly ₁ , His ₁ , Lys ₃ , Ile ₁ , Val ₃ , Pro ₁ , Tyr ₁)
BS-5	Lys-Pro-Lys-Leu-Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg-Ala

деление С-концевой последовательности с помощью карбоксипептидаз А и В показало, что фрагмент СВ-3 имеет структуру, идентичную С-концевой последовательности бедка (т. е. является С-концевым), а фрагмент СВ-1 имеет С-концевую последовательность -Lys-Val-Hse. Установлено, что N-концевая последовательность фрагмента СВ-1 совпадает с N-концевой последовательностью белка. Из вышеизложенного следует, что фрагмент СВ-2 находится между фрагментами СВ-1 и СВ-3.

Определение аминокислотной последовательности автоматическим методом по Эдману дало следующие результаты. На целой молекуле белка определена N-концевая последовательность до аминокислотного остатка в положении 35. Последовательность 2—35 была подтверждена автоматическим анализом последовательности фрагмента СВ-1. На фрагменте СВ-3 была установлена N-концевая последовательность 32 аминокислотных остатков. Таким образом, полученные данные позволили соединить в одну полипептидную цепь следующие триптические пептиды: Т-1, Т-2, Т-3, Т-4, Т-5, Т-6, Т-7, Т-8, а также Т-9, Т-10, Т-11, Т-12, Т-13. Перекрытие фрагментов Т-8, Т-9, Т-10 достигнуто определением структуры пептидов, полученных при ограниченном триптическом гидролизе молекулы белка, а также определением структуры пептидов, образовавшихся при расщеплении бромциановых фрагментов по остаткам тирозина.

В молекуле белка содержится 6 остатков аргинина, из них 4 остатка находятся в N-концевом фрагменте СВ-1 и 2 остатка — в С-концевом фрагменте СВ-3, причем положение этих остатков определено при автоматическом анализе последовательности соответствующих пептидных фрагментов. В результате ограниченного триптического гидролиза молекулы белка по остаткам аргинина было выделено 5 пептидов (см. табл. 2), в том числе пептид LT-4 (22—79), в котором автоматическим методом по Эдману была определена последовательность, соответствующая последовательности 22—57 в молекуле белка.

Таким образом, с помощью метода автоматического анализа была установлена последовательность аминокислотных остатков 1—82. Последовательность 83—94 определена в результате исследования дансильным методом Эдмана пептидов LT-5 Т-16, а также четырех С-концевых аминокислот в молекуле белка, бромциановом фрагменте СВ-3 и пептиде Т-16. Получена следующая полная аминокислотная последовательность белка L25:

Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Ala-Glu-Val-Arg-Lys-Glu-Gln-Gly-Lys-Gly-Ala--Ser-
 Arg-Arg-Leu-Arg-Ala-Ala-Asn-Lys-Phe-Pro-Ala-Ile-Ile-Tyr-Gly-Gly-Lys-Glu-
 Ala-Pro-Leu-Ala-Ile-Glu-Leu-Asp-His-Asp-Lys-Val-Met-Asn-Met-Gln-Ala-
 Lys-Ala-Glu-Phe-Tyr-Ser-Glu-Val-Leu-Thr-Ile-Val-Val-Asp-Gly-Lys-Glu-
 Ile-Lys-Val-Lys-Ala-Gln-Asp-Val-Gln-Arg-His-Pro-Tyr-Lys-Pro-Lys-Leu-
 Gln-His-Ile-Asp-Phe-Val-Arg-Ala

Точный молекулярный вес белка равен 10 912, полипептидная цепь состоит из 94 аминокислотных остатков и имеет следующий аминокислотный состав:

Asp₅, Asn₃, Thr₂, Ser₂, Glu₇, Gln₅, Pro₄, Gly₅, Ala₁₁, Val₃, Met₃, Ile₇, Leu₅, Tyr₃, Phe₄, His₃, Lys₁₁, Arg₆.

Завышенное содержание остатков изолейцина и заниженное — лейцина по сравнению с данными работы [3] может быть объяснено различием в штаммах *E. coli*, использованных для получения белка.

Аминокислотная последовательность белка L25 была подтверждена определением структуры пептидов, выделенных из триптического и ограниченного триптического гидролизатов, и, кроме того, определением структуры пептидов, образовавшихся при расщеплении бромциановых фрагментов СВ-1 и СВ-3 по остаткам тирозина -31, -57, -82 (см. табл. 3). Структура пептидов BS-2 и Т-10 (54—68) определялась на секвенсоре после модификации их реагентом Браунитцера III [5]. При проведении триптического гидролиза оказались неполностью расщепленными связи -Lys-Phe-(25, 26), -Lys-Val-(46, 47), -Lys-Val-(71, 72), -Arg-His-(79, 80), -Lys-Pro-(83, 84), что в ряде случаев позволило получить дополнительное перекрытие триптических фрагментов.

Таким образом, установление первичной структуры белка L25 позволит получить дополнительные данные о взаимодействии белок — РНК, поскольку белок L25 образует стабильный функционально активный комплекс с 5S РНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horne J. R., Erdmann V. A. (1972) Mol. and Gen. Genetics., **119**, 337—344.
2. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **67**, 1909—1913.
3. Kaltschmidt E., Dzionara M., Wittmann H. G. (1970) Mol. and Gen. Genetics., **109**, 292—297.
4. Kolb E., Harris J. J., Bridgen J. (1974) Biochem. J., **137**, 185—197.
5. Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**, 1730—1733.

Поступила в редакцию
28.11.1975

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20/1-1975 г. Т-02078 Подписано к печати 26/II—1975 г. Тираж 750 экз.
Зак. 1624 Формат бумаги 70×108¹/₁₆ Усл. печ. л. 12,6 Бум. л. 4¹/₂ Уч.-изд. л. 12,9

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10