



УДК 577.152.34:577.112.5

ТИОЛЗАВИСИМЫЕ СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

III*. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ВБЛИЗИ ОСТАТКА СЕРИНА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПРОТЕИНАЗ *BACILLUS THURINGIENSIS* И *BACILLUS CEREUS*

Загитыко О. П., Честухина Г. Г., Ревина Л. П., Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Проведено расщепление тиолзависимых сериновых протеиназ *Bacillus thuringiensis* и *B. cereus* по единственному имеющемуся в их структуре остатку Met и выделены образующиеся при этом N- и C-концевые фрагменты. Аминокислотные последовательности C-концевых фрагментов протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus* идентичны на протяжении 21 остатка: -Ala-Thr-Pro-Xaa-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Leu-Ala-Asn-Gln-Gly-Tyr-Ser-Asn-Thr-Gln. Эти последовательности чрезвычайно близки последовательности тиолзависимой сериновой протеиназы *Thermoactinomyces vulgaris* (степень гомологии 73%), начинающейся сразу после остатка Met²²², которому во всех субтилизинах предшествует остаток Ser²²¹ активного центра этих протеиназ. Гомология между тиолзависимыми сериновыми протеиназами бацилл и субтилизином BPN' на изученном участке составляет 50%. Полученные результаты свидетельствуют о структурном сходстве тиолзависимых сериновых протеиназ и субтилизинов и о глубоком родстве между тиолзависимыми протеиназами *B. thuringiensis* и *B. cereus* и термоактиномицетами и подтверждают высказанное ранее предположение о существовании отдельного подсемейства тиолзависимых сериновых протеиназ в составе семейства эволюционно родственных субтилизинов.

Как было показано ранее [1-3], два родственных вида бацилл, *Bacillus thuringiensis* и *B. cereus*, секретируют очень сходные сериновые протеиназы, характеризующиеся присутствием в их структуре остатка цистеина, блокирование которого ионами ртути или *n*-оксимеркурибензоатом инактивирует эти ферменты. Установлено также структурное сходство N-концевых аминокислотных последовательностей этих ферментов и тиолзависимой внеклеточной сериновой протеиназы *Thermoactinomyces vulgaris* [4, 5]. Эти данные послужили основанием для предположения, что тиолзависимые сериновые протеиназы этих двух видов бацилл, термоактиномицетов и, видимо, *Streptomyces rectus* [6] образуют подсемейство тиолзависимых сериновых протеиназ, которое входит составной частью в обширное семейство субтилизинов.

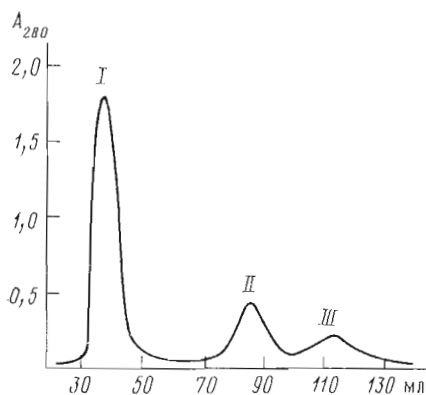
Для дальнейшего развития этих представлений было необходимо расширить данные о первичной структуре исследуемых ферментов, прежде всего за счет участков, включающих функционально важные аминокислотные остатки. Это позволило бы сделать более информативным сопоставление первичных структур тиолзависимых сериновых протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus*, а также *T. vulgaris*. Было необходимо также получить данные о степени структурного родства ферментов из двух видов бацилл, *B. thuringiensis* и *B. cereus*, и наиболее изученных внеклеточных протеиназ семейства субтилизина. Сопоставление N-концевых последовательностей [1] дало лишь скудные указания на наличие отдаленного сходства между первичными структурами этих ферментов. В результате само отнесение тиолзависимых сериновых протеиназ, упомянутых выше видов бацилл, к семейству субтилизина было основано на их функциональном сходстве и соответствии ряда общих характеристик — молекулярной массы, аминокислотного состава, некоторых энзимологических свойств, но не мог-

* Сообщение II см. [4]. Xaa — неидентифицированный аминокислотный остаток.

ло опираться на прямые структурные данные. Сравнение с субтилизинами делалось лишь косвенно, с учетом сходства как этих протеиназ, так и тиолзависимых сериновых протеиназ бацилл с тиолзависимым ферментом из термоактиномицетов.

Целью данной работы явилось сопоставление первичных структур участков ферментов, непосредственно примыкающих к остатку серина активного центра. Для этого было проведено расщепление тиолзависимых сериновых протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus* по единственному имеющемуся в их структуре остатку метионина.

Расщепленно бромцианом подвергались тиолзависимые сериновые протеиназы *B. thuringiensis* подвида *galleriae* и *B. cereus*, предварительно ингибированные ионами Hg^{2+} во избежание возможных помех за счет автолиза. Контроль методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия



Разделение продуктов бромцианового гидролиза протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus* на колонке с сефадексом G-100 в 10% муравьиной кислоте

10% муравьиной кислоте. Несмотря на применение муравьиной кислоты в качестве денатурирующего растворителя, разделение существенно осложнено агрегацией фрагментов, которой особенно способствует лиофильное высушивание смеси после расщепления бромцианом. Лучшие результаты дает гель-фильтрация реакционной смеси без предварительного высушивания (рисунок). При этом фракция I содержит гомогенный, согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, пептид с молекулярной массой 28 000, а фракция II — пептид с молекулярной массой ~6000. Выход последнего составил около 30%.

В дальнейшем был найден значительно более удобный способ отделения низкомолекулярного фрагмента ультрафильтрацией продуктов расщепления бромцианом через мембрану УМ-10 («Амикон»). Низкомолекулярный пептид с молекулярной массой ~6000 в отличие от высокомолекулярного фрагмента не задерживается этой мембраной и выделяется с практически количественным выходом.

Аминокислотный состав полученных фрагментов протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus* приведен в таблице. Малье, не содержащие в своем составе гомосерина, фрагменты обеих протеиназ соответствуют С-концевым участкам молекул и практически не отличаются между собой по аминокислотному составу. Их отличие от состава соответствующего участка протеиназы *T. vulgaris* [5] также невелико и заключается в несколько повышенном содержании остатков дикарбоновых аминокислот, а также остатков лизина, треонина, пролина и валина.

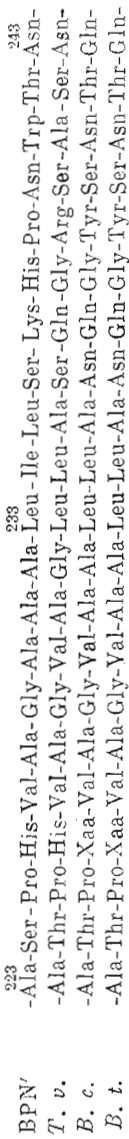
Результаты определения N-концевых аминокислотных последовательностей С-концевых фрагментов протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus* (схема 1) позволяют сделать ряд выводов.

Во-первых, последовательности 222–243 фрагментов из *B. thuringien-*

Аминокислотный состав фрагментов, полученных при гидролизе бромцианом тлоза висимых серийных протеназ

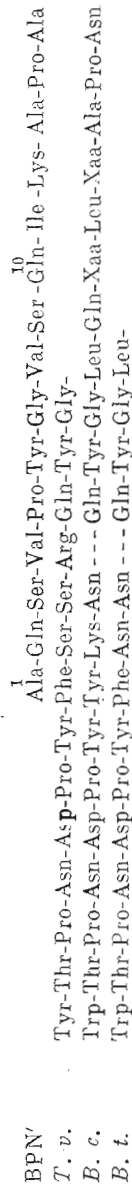
Аминокислота	<i>T. vulgaris</i> [7]			<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galactae</i>			<i>B. cereus</i>		
	Белок	N-Концевой фрагмент	C-Концевой фрагмент	Белок [3]	N-Концевой фрагмент	C-Концевой фрагмент	Белок [3]	N-Концевой фрагмент	C-Концевой фрагмент
Lys	41	8	3	41	7,6(8)	3,4(3)	42	8,1(8)	3,6(4)
His	4	3	1	5	3,9(4)	1,2(1)	6	4,8(5)	1,2(1)
Arg	6	3	3	6	3,7(4)	1,9(2)	5	3,7(4)	2,1(2)
Asp	37	33	4	33	28,4(28)	5,4(5)	31	27,4(27)	6,4(6)
Thr	22	18	4	21	15,4(15)	6,3(6)	20	15,2(15)	6,6(6-7)
Ser	31	27	4	27	23,4(23)	4,2(4)	32	28,4(28)	4,3(4)
Gln	15	12	3	24	18,8(19)	6,1(6)	26	18,3(18)	7,3(7)
Pro	13	12	4	12	9,9(10)	1,7(2)	11	8,7(9)	1,8(2)
Gly	34	28	16	32	27,2(27)	6,4(6)	31	25,4(25)	6,1(6)
Ala	44	33	11	37	30,1(30)	7,4(7)	35	26,6(27)	8,7(9)
Cys	1	1	0	1	0,8(1)	0	1	0,7(1)	0
Val	24	20	4	24	18,6(19)	4,7(5)	21	16,6(17)	3,6(4)
Ile	15	12	3	14	10,6(11)	2,5(3)	14	10,5(11)	3,6(4)
Leu	10	8	2	12	9,8(10)	1,8(2)	12	9,6(10)	1,8(2)
Tyr	15	12	3	15	12,5(12)	2,1(2)	14	11,3(11)	3,1(3)
Phe	3	3	0	3	2,2(2)	1,0(1)	1-2	0,9(1)	0
Trp	7	6	1	5	-	-	5	-	-
Met	1	0	0	1	0	0	1	0	0
H-Ser	1	0	0	1	0,8(1)	0	0	0,85(1)	0
Сумма остатков	293	240	53	283	223,6(224)	55,8(55)	281-282	217,05(218)	61,6(61)

Схема 1



N-Концевые последовательности C-концевых BrCN-фрагментов сериновых протеиназ *T. vulgaris* (Т. в.) [8], *B. cereus* (В. с.), *B. thuringiensis* (В. т.) и субтилизина BPN' [9]. Согласно гомологии первичных структур сериновых протеиназ и специфичности BrCN-расщепления, всем приведенным последовательностям предшествуют Ser²²¹ и Met²²²

Схема 2



N-Концевые последовательности сериновых протеиназ *T. vulgaris* [8], *B. cereus*, *B. thuringiensis* и субтилизина BPN' [9]

sis и *B. cereus* полностью совпадают. N-Концевые последовательности этих ферментов также очень близки (схема 2). Так, ранее (см. [1]) для них отмечено совпадение 12 аминокислотных остатков из 14 сравниваемых. Эти результаты подтверждены в данной работе, в которой удалось окончательно идентифицировать в протеиназе *B. cereus* остаток Lys⁸ и последовательность до Asp²², а также дополнительно идентифицировать совпадающие у обеих протеиназ остатки Leu¹⁵.

Во-вторых, выявилось очень большое сходство участков 222–243 тиолзависимых сериновых протеиназ термоактиномицетов [8] и двух видов бактерий — единственное различие состоит в замене остатка Ala²³² у протеиназ бактерий на Gly в протеиназе термоактиномицетов (весьма возможно, что неидентифицированный остаток 226 в протеиназах бактерий так же, как и в протеиназе термоактиномицетов, соответствует His). В N-концевых участках этих ферментов несколько меньшее соответствие: 64% при сравнении протеиназ *T. vulgaris* и *B. cereus*, 71% — для пары протеиназ *T. vulgaris* и *B. thuringiensis*.

В-третьих, впервые удалось прямо показать структурное соответствие тиолзависимых сериновых протеиназ бактерий и субтилизина (для примера рассмотрен субтилизин BPN¹). На участке 222–243 из 22 сравниваемых аминокислотных остатков у субтилизина и протеиназ *B. cereus* и *B. thuringiensis* совпадают 11 (50%). Это бесспорное свидетельство гомологии первичных структур, видимо, распространяющейся и на пространственные структуры. Сходство гораздо выше при сопоставлении непосредственно примыкающего к Ser²²¹ участка 222–233: на нем из 11 сравниваемых совпадает 9 аминокислотных остатков, или 82%. Очевидно, этот участок менее вариабелен из-за функциональной «нагруженности». Отметим, что использовавшийся нами ранее способ совмещения аминоконцевых последовательностей [1] давал степень гомологии субтилизина и тиолзависимых протеиназ, которую трудно признать значащей. Предлагаемый ныне способ совмещения (схема 2), при котором тиолзависимые протеиназы оказываются на 7 остатков длиннее, чем субтилизины, дает несколько более существенный уровень совпадений — 4 остатка из 15 сравниваемых*.

Таким образом, тиолзависимые сериновые протеиназы *B. cereus* и *B. thuringiensis* чрезвычайно близки между собой, что отражает близость этих двух видов бактерий. В то же время обе они весьма близки и протеиназе из термоактиномицетов. Консерватизм первичных структур тиолзависимых сериновых протеиназ микроорганизмов, до последнего времени считавшихся принадлежащими к весьма различным таксонам, требует внимательного анализа и может указывать на эволюционные связи между термоактиномицетами и упоминавшимися выше двумя видами бактерий. Наконец, получены несомненные свидетельства структурного родства тиолзависимых сериновых протеиназ и субтилизина, надежно обосновывающие принадлежность подсемейства тиолзависимых сериновых протеиназ к семейству эволюционно родственных субтилизинов.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефадекс G-100, fine (Pharmacia, Швеция), ультрамембрану UM-10 (Amicon, США), акриламид, метиленбисакриламид, тетраметиленамин, кумасси голубой R-250 (Serva, ФРГ).

Выделение и очистку внеклеточных сериновых протеиназ *B. thuringiensis* и *B. cereus* проводили по описанной ранее методике [1].

Расщепление ферментов бромцианом осуществляли в соответствии с методикой [5]. 20 мг лиофильно высушенного фермента, ингибированного ацетатом ртути, растворяли в 0,36 мл 99,9% HCOOH, после чего добавляли 0,15 мл воды, доводя концентрацию кислоты до 70%. Затем к раствору фермента добавляли 20 мг бромциана (300-кратный избыток) в 0,5 мл 70% HCOOH. Смесь инкубировали 24 ч при 20° С и полученные

* Авторы благодарны доктору В. Хёне (Университет им. Гумбольдта в Берлине), который указал на целесообразность такого совмещения последовательностей субтилизина и протеиназы из *T. vulgaris*.

фрагменты разделяли гель-фильтрацией реакционной смеси на колонке с сефадексом G-100 (1,5×85 см), уравновешенной 10% HCOOH. Скорость элюции 13 мл/ч. Выход фракций контролировали по поглощению элюата при 280 нм.

Для разделения продуктов бромцианового гидролиза ультрафильтрацией реакционную смесь разводили водой в 7 раз и помещали в ячейку с мембраной UM-10 под азотом при давлении 3 атм. После продавливания раствора через мембрану к сконцентрированному над мембраной раствору высокомолекулярного фрагмента добавляли 10% HCOOH (2×5 мл) и фильтровали раствор при том же давлении.

Чистоту выделенных фрагментов контролировали с помощью электрофореза в слое 12,5% полиакриламидного геля в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия и 8 М мочевины [10]. Перед нанесением на гель образцы кипятили 5 мин в растворе 8 М мочевины, 1% додецилсульфата натрия и 1% меркаптоэтанола. В качестве маркера использовали бромфеноловый синий. После электрофореза гели окрашивали кумасси голубым R-250 [11]. Аминокислотный анализ солянокислых гидролизатов белка (105° С, 24 ч) проводили на аминокислотном анализаторе Durrum-500. Цистеин и метионин определяли в виде цистеиновой кислоты и метионинсульфона соответственно [12]. Для определения триптофана белок гидролизovali метасульфокислотой [13].

Определение N-концевой аминокислотной последовательности белков осуществляли автоматическим методом Эдмана на секвенаторе модели 890 С (Beckman, США) с использованием 1 М квадрольной программы. Автоматической фрагментации подвергали около 3 мг ферментов. N-Концевую аминокислотную последовательность бромциановых фрагментов белков определяли на твердофазном секвенаторе APS 240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное связывание пептидов с аминопропил-стеклом осуществляли *n*-фенилэдициотиоцианатным методом [14]. Для иммобилизации использовали 60–100 нмоль пептида. Изомеризацию тиазолинонов в фенилтиогидантоины аминокислот проводили в течение 10 мин в 1 н. HCl при 80° С. Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали микротонкослойной одномерной хроматографией на пластинках (5×5 см) Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ), используя последовательно системы растворителей: хлороформ, содержащий 1,5% этанола (3 раза); хлороформ – метанол (9 : 0,5); хлороформ – ледяная уксусная кислота (8 : 2). Оценка интенсивности пятен Pth-производных аминокислот проводили денситометрированием хроматограмм на спектрофотометре Orton (ФРГ) при 265 нм. Для идентификации фенилтиогидантоинов аминокислот использовали также газовую хроматографию по методу [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Честухина Г. Г., Епремян А. С., Гайда А. В., Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1649–1658.
2. Епремян А. С., Честухина Г. Г., Азизбекян Р. Р., Негыкса Е. М., Руденская Г. Н., Степанов В. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 920–929.
3. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 100, № 4, p. 1680–1687.
4. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова Н. Г., Куприянова Т. И., Хохлова Ю. М., Усайте И. А., Логинова Л. Г., Тимохина Е. А. Биохимия, 1980, т. 45, № 10, с. 1871–1880.
5. Hausdorf G., Krüger K., Pöhne W. E. Int. J. Peptide and Protein Res., 1980, v. 15, № 2, p. 420–425.
6. Mizusawa K., Yoshida F. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 21, p. 6978–6984.
7. Panyin S., Thitiopongranich R., Supatimusro D. Anal. Biochem., 1977, v. 81, № 2, p. 320–327.
8. Baudys M., Kostka V., Gruner K., Hausdorf G., Pöhne W. E. Int. J. Peptide Res., 1982, v. 17, № 19, p. 32–39.
9. Kurihara M., Markland F. S., Smith E. L. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 17, p. 5619–5631.
10. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406–4412.
11. Holbrook J. B., Laver A. G. Anal. Biochem., 1976, v. 75, № 2, p. 634–636.
12. Hirs C. H. W. In: Methods in Enzymology / Eds Colowich S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press 1967, v. 11, p. 59–62.

13. Penke B., Ferenzi R., Kovacs K. Anal. Biochem., 1974, v. 60, № 1, p. 45-50.
14. Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G. FEBS Lett., 1972, v. 21, № 1, p. 67-70.
15. Pisano J. J., Bronzort T. J., Brewer H. B. Anal. Biochem., 1972, v. 45, № 1, p. 43-59.

Поступила в редакцию
20.VII.1983
После доработки
14.IX.1983

THIOL-DEPENDENT SERINE PROTEINASES. III. AMINO ACID SEQUENCES
ADJACENT TO ACTIVE SITE SERINE RESIDUE IN *BACILLUS THURINGI-*
ENSIS AND *BACILLUS CEREUS* PROTEINASES

ZAGNITKO O. P., CHESTUKHINA G. G., REVINA L. P., STEPANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

To compare the extracellular thiol-dependent serine proteinases produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*, their amino acid sequences adjacent to the Ser²²¹ of the active site (subtilisin numbering) were established. The C-terminal fragments of these enzymes formed by CNBr-cleavage at the Met²²² residue were separated by gel filtration or ultrafiltration, and then sequenced by an automated solid phase procedure. The fragments from *B. thuringiensis* and *B. cereus* proteinases are identical and share 73% identical residues with *Thermoactinomyces vulgaris* thiol-dependent serine proteinase, but only 50% with subtilisin BPN'. The data obtained demonstrate extremely high similarity of *B. thuringiensis* and *B. cereus* thiol-dependent serine proteinases, and their close relatedness to *T. vulgaris* thiol-dependent serine proteinase. These observations confirm the earlier suggestion that thiol-dependent serine proteinases of certain bacilli species and thermoactinomycetes form a separate subfamily of evolutionary related proteinases.