



УДК 577.152.34:577.112.5

## ТИОЛЗАВИСИМЫЕ СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

## IV. \* ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА ПРОТЕИНАЗЫ

*BACILLUS THURINGIENSIS*Загитъко О. П., Ревина Л. П., Честухина Г. Г.,  
Левин Е. Д., Степанов В. М.Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Определена первичная структура 55-членного С-концевого участка тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus thuringiensis*. С этой целью С-концевой фрагмент, полученный в результате расщепления белка бромцианом по единственному остатку метионина, подвергали как полному, так и ограниченному гидролизу трипсином. Установлена последовательность аминокислотных остатков, следующих за Met<sup>222</sup>: Ala-Thr-Pro-His-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Leu-Ala-Asn-Gln-Gly-Tyr-Ser-Asn-Thr-Gln-Ile-Arg-Gln-Ile-Ile-Glu-Ser-Thr-Thr-Asp-Lys-Ile-Ser-Gly-Thr-Gly-Thr-Tyr-Trp-Lys-Asn-Gly-Arg-Val-Asn-Ala-Tyr-Lys-Ala-Val-Gln-Tyr-Ala-Lys. Впервые удалось показать структурную близость тиолзависимых сериновых протеиназ бацилл и субтилизинов: гомология между протеиназой *B. thuringiensis* и субтилизинами Карлсберг и BPN' на изученном участке составляет соответственно 43 и 39%. В то же время несомненное структурное сходство С-концевого фрагмента протеиназы *B. thuringiensis* с соответствующим участком протеиназы термоактиномицетов *Thermoactinomyces vulgaris* (78% совпадений) подтверждает высказанное ранее предположение о существовании отдельного подсемейства тиолзависимых сериновых протеиназ в составе семейства эволюционно родственных субтилизинов.

Ранее было показано, что бактерии вида *Bacillus thuringiensis* секретируют сериновые протеиназы, содержащие функционально важный остаток цистеина [2, 3]. По структурным и функциональным характеристикам эти ферменты, получившие название тиолзависимых сериновых протеиназ, необычайно близки термитазе — протеиназе, выделенной из термоактиномицетов *Thermoactinomyces vulgaris* [4, 5]. Для протеиназы из *B. thuringiensis*, а также фермента, секретируемого близкородственным видом бацилл *B. cereus* [6], были определены N-концевые последовательности и участки первичной структуры, примыкающие непосредственно к остатку Ser<sup>221</sup> активного центра. Их сравнение с соответствующими последовательностями термитазы и субтилизинов обнаружило гораздо большее сходство между фрагментами *B. cereus*, *B. thuringiensis* и термитазой, чем между каждым из них в отдельности и субтилизинами — сериновыми протеиназами *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*. Эти данные позволили предположить, что тиолзависимые сериновые протеиназы *B. thuringiensis*, *B. cereus* и *Tha. vulgaris* образуют в обширном семействе субтилизинов подсемейство тиолзависимых сериновых протеиназ. Однако для окончательного вывода требовались более полные данные о первичной структуре сравниваемых ферментов.

Для термитазы была определена С-концевая последовательность 53 аминокислотных остатков [7]. Ранее нами было описано выделение аналогичного С-концевого фрагмента протеиназы *B. thuringiensis*, полученного в результате расщепления бромцианом полипептидной цепи фермента по единственному остатку метионина и установлена последовательность 21 аминокислотного остатка в его N-концевой части [1]. Цель данной работы — определение полной первичной структуры этого фрагмента и ее сравнение с соответствующими участками термитазы и субтилизинов.

\* Сообщение III см. [1].

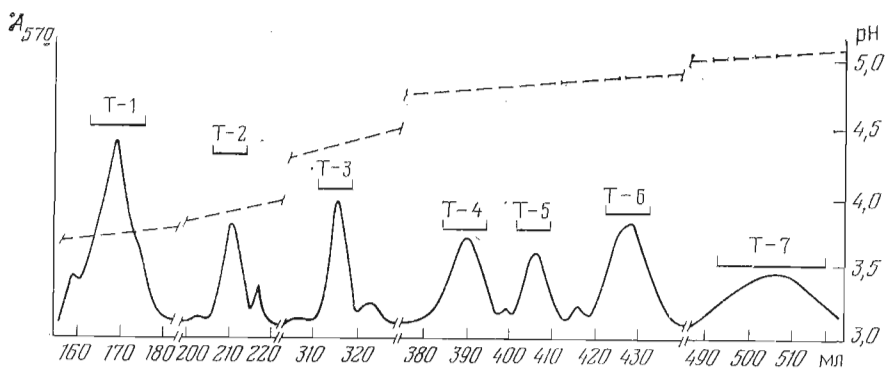


Рис. 1

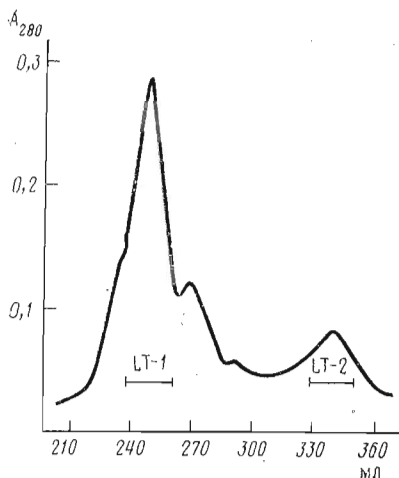


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография трипсинового гидролизата С-концевого бромцианового фрагмента протеиназы *B. thuringiensis* на Chromobeads P (0,6×90 см) в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера. Здесь и на рис. 2 обозначены границы собранных фракций

Рис. 2. Хроматография продуктов ограниченного трипсинового гидролиза С-концевого бромцианового фрагмента протеиназы *B. thuringiensis* на сефадексе G-25 (2,5××90 см) в 0,1 М НСООН

Анализ аминокислотной последовательности С-концевого бромцианового фрагмента протеиназы *B. thuringiensis* проводили на основании исследования структур пептидов, выделенных при полном и ограниченном его протеолизе трипсином, а также данных твердофазного секвенирования и-тактного полипептида. Следует заметить, что С-концевой фрагмент протеиназы *B. thuringiensis* ведет себя несколько необычно — он трудно-растворим и, видимо, склонен к агрегации. Это осложняет ход трипсинового гидролиза, которому подвергается суспензия фрагмента, и приводит к снижению выхода образующихся пептидов.

Пептиды, полученные в результате триптического гидролиза С-концевого фрагмента протеиназы, разделяли на сульфополистирольном катионите (рис. 1). Фракции Т-1, Т-3 — Т-7, по данным аминокислотного анализа и ТСХ, представляли собой гомогенные пептиды. Фракция Т-2 при ТСХ давала несколько пептидных пятен. После многократной очистки с помощью ТСХ из нее с выходом 1% был выделен пептид Т-2-4.

Для проведения ограниченного трипсинового гидролиза С-концевого BrCN-фрагмента протеиназы *B. thuringiensis* аминокислотные группы полипептида модифицировали цитраконовым ангидридом, по окончании гидролиза полипептид децитраконалировали. Продукты гидролиза разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,1 М муравьиной кислоте (рис. 2). Из пика LT-1 методом ТСХ были выделены пептидные фракции LT-1-1 и LT-1-2. Пик LT-2 содержал пептид LT-2, полученный с очень небольшим выходом (1,5%).

Аминокислотный состав и выходы пептидов, полученных при полном и ограниченном гидролизе трипсином, приведены в табл. 1.



Схема 1. Аминокислотная последовательность С-концевого бромляцетового фрагмента протеиназы *B. thuringiensis*. Пунктирной линией подчеркнута последовательность, установленная с помощью твердофазного секвенатора. Сплошной линией обозначены периоды полного (Т) и ограниченного (ЛТ) гидролиза трипсином

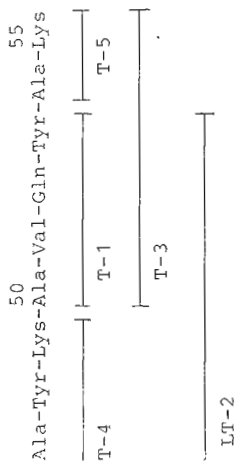
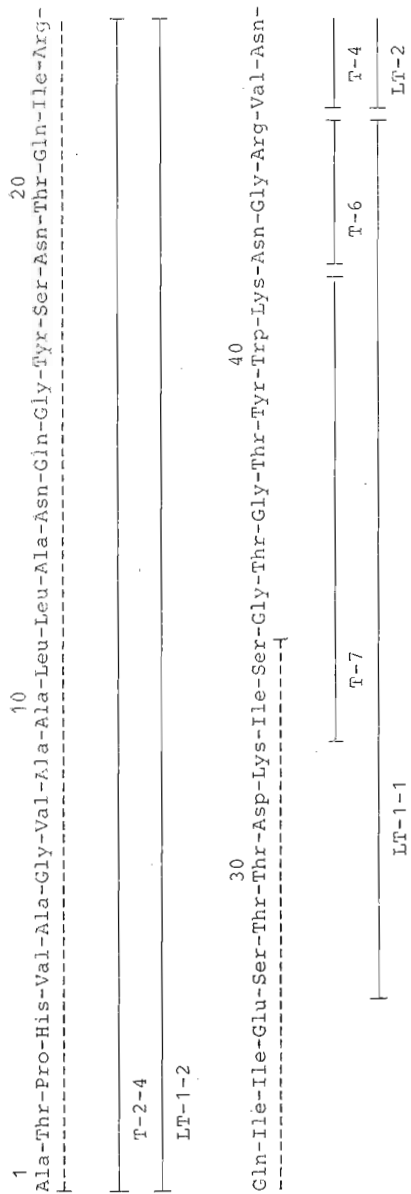


Схема 2. Последовательность С-концевых участков внеклеточных протеиназ *B. thuringiensis* (*B. th.*), *Th. vulgaris* (*Th. v.*) и субтилизина ВРН (*B. a.*) и Карлсберг (*B. l.*) в однобуквенном коде. Нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации субтилизина [8]



Пептиды Т-2-4 и LT-1-2 идентичны по аминокислотному составу, содержат остаток аланина на N-конце, остаток аргинина на C-конце и соответствуют N-концевому участку бромцианового C-концевого фрагмента протеиназы *B. thuringiensis*, структура которого 1-21 (за исключением идентификации His<sup>4</sup>) установлена ранее [1] и подтверждена в настоящей работе при твердофазном секвенировании интактного полипептида (см. схему 1 и табл. 2).

Пептид Т-7 содержит 9 аминокислотных остатков. N-Концевым остатком является изолейцин. Карбоксипептидаза В отщепляет в пептиде C-концевой остаток лизина, а карбоксипептидаза А, добавленная после действия карбоксипептидазы В, — 0,8 остатка триптофана и 0,7 тирозина. N-Концевая последовательность аминокислот в пептиде установлена с помощью твердофазного секвенатора (табл. 2). Трипептид Т-6 имеет остаток аспарагина или аспарагиновой кислоты на N-конце и остаток аргинина на C-конце. При электрофорезе на бумаге при pH 5,6 пептид Т-6 смещается к катоду. Это позволяет утверждать, что N-концевым в данном пептиде является остаток аспарагина.

Пептид LT-1-1 содержит 17 аминокислотных остатков и включает в себя упомянутые выше пептиды Т-6 и Т-7. С помощью твердофазного секвенатора определена последовательность 14 остатков LT-1-1. Гидролиз пептида карбоксипептидазой В позволил установить, что C-концевым является остаток аргинина. Пептид LT-1-1 на 5 аминокислотных остатков длиннее пептида Т-7 в N-концевой части и, по-видимому, образовался в результате неспецифического гидролиза пептидной связи между остатками Glu<sup>27</sup> и Ser<sup>28</sup> (схема 1).

Структура пептидов Т-1 и Т-4 идентична соответствующим структурам C-концевых фрагментов термитазы, и поэтому их локализация не представляла труда.

Аминокислотный состав пептида LT-2 соответствует сумме пептидов Т-1 и Т-4. Из-за малого количества пептида для LT-2 удалось установить последовательность только 4 N-концевых аминокислотных остатков. Совпадение N-концевых последовательностей пептидов LT-2 и Т-4 показывает, что пептид Т-1 следует в структуре анализируемого бромцианового фрагмента протеиназы *B. thuringiensis* за пептидом Т-4.

Пептид Т-3 содержит 6 аминокислотных остатков. Последовательность пептида Т-3 суммирует структуры, представленные пептидами Т-1 и Т-5.

Для подтверждения структуры C-концевого участка анализируемого бромцианового фрагмента белка протеиназу *B. thuringiensis*, предварительно ингибированную диизопротилфторфосфатом и обработанную фенолом, гидролизировали карбоксипептидазами А и В. Гидролиз карбоксипептидазой А не дал результата, а карбоксипептидаза В отщепляет остаток лизина. При обработке белка карбоксипептидазой В, а затем карбоксипептидазой А последовательно отщепляется по одному остатку лизина, аланина, глутамина и 0,5 валина. Этот результат хорошо согласуется с C-концевой последовательностью пептида Т-3 и еще раз подтверждает то, что он является C-концевым в структуре белка. Протеиназа *B. thuringiensis* оказывается на 2 аминокислотных остатка (лизин и аланин) длиннее в C-концевой части, чем термитаза.

Таким образом, в результате полного и ограниченного триптического гидролиза C-концевого фрагмента *B. thuringiensis* получена система перекрывающихся пептидов. Кроме того, с помощью твердофазного секвенатора была определена последовательность 34 аминокислотных остатков в N-концевом участке интактного фрагмента. Эти данные позволили однозначно установить первичную структуру C-концевого фрагмента внеклеточной сериновой протеиназы *B. thuringiensis* (схема 1).

Определение первичной структуры C-концевого фрагмента внеклеточной протеиназы *B. thuringiensis* позволило сделать следующие выводы:

1) впервые удалось показать структурную близость тиолзависимых сериновых протеиназ бацилл и субтилизинов (схема 2). Из 51 сравнимого аминокислотного остатка у протеиназы *B. thuringiensis* с субтилизинами Карлсберг и BPN' совпадает соответственно 22 (43%) и 20 (39%)

остатков. Заметим, что такой же процент гомологии с субтилизинами Карлсберг и ВРН' обнаружен у другой тиолзависимой протеиназы — термитазы: 43 и 37% соответственно. Значительно большее сходство (82% совпадений) наблюдается при сопоставлении участков 222—233, непосредственно примыкающих к остатку серина активного центра. Видимо, этот участок менее вариабелен из-за большей функциональной «нагруженности». Таким образом, получено структурное обоснование эволюционного родства тиолзависимых сериновых протеиназ и субтилизинов;

2) выявлено очень большое структурное сходство С-концевого фрагмента внеклеточной сериновой протеиназы *B. thuringiensis* с соответствующим участком термитазы: совпадает 41 остаток из 53 (78%). Большинство замен приходится на центральные участки бромциановых фрагментов, а их N- и С-концевые отрезки практически совпадают. Так как, согласно данным работы [7], эти участки бромцианового фрагмента термитазы образуют  $\alpha$ -спирали, для фрагмента *B. thuringiensis* можно предположить аналогичную организацию полипептидной цепи. Напомним, что для тиолзависимой сериновой протеиназы близкородственного вида бактерия *B. cereus* 20 N-концевых остатков бромцианового фрагмента полностью совпадают с соответствующей последовательностью протеиназы *B. thuringiensis* [1]. Приведенные выше данные позволяют с большей определенностью утверждать, что внеклеточные сериновые протеиназы *B. thuringiensis*, *B. cereus* и протеиназа термоактиномицетов *Tha. vulgaris* образуют подсемейство тиолзависимых протеиназ в рамках семейства субтилизинов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), смолу Chromobeads P, 2-1-01-18 (A) T2 15-03-58-04 (Ирландия), бычий трипсин (Merck, ФРГ), карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), диметиламинонафталинсульфохлорид, фенилизотиоцианат, трифторуксусную кислоту (Fluka, Швейцария), диизопропилфторфосфат (Serva, ФРГ).

Выделение и очистку внеклеточной сериновой протеиназы *B. thuringiensis* проводили по описанной ранее методике [6]. Расщепление протеиназы *B. thuringiensis* бромцианом и разделение фрагментов описано в нашей предыдущей работе [1]. Анализ аминокислотных последовательностей пептидов на твердофазном секвенаторе AP 240 (Rank Hilger, Англия) осуществляли по методике, описанной ранее [1].

Трипсин дополнительно очищали хроматографией на STI-агарозе по методике [9].

*Исчерпывающий гидролиз трипсином.* 15 мг (2,5 мкмоль) лиофильно высушенного С-концевого бромцианового фрагмента *B. thuringiensis* растворяли в 10 мл 0,05 М триэтиламоний-карбонатного буфера (рН 8,3), к суспензии добавляли 0,15 мг очищенного трипсина в 150 мкл этого же буфера. Гидролиз вели 2 ч при 37° С, затем добавляли еще 0,15 мг трипсина в 150 мкл буфера и продолжали инкубацию 2 ч при 37° С. По окончании гидролиза отделяли осадок центрифугированием, надосадочную жидкость лиофилизировали, отобраз аликвоту на аминокислотный анализ. По данным аминокислотного анализа, надосадочная жидкость содержит 8,4 мг (1,4 мкмоль) гидролизованного бромцианового фрагмента.

*Разделение триптического гидролизата.* К 4 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера (рН 3,1) добавляли муравьиную кислоту до рН 2,5 и в этой смеси растворяли триптический гидролизат. Раствор наносили под давлением азота на колонку со смолой Chromobeads P (0,6×90 см). Хроматографию вели при 37° С вначале 80 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 3,1, затем линейным градиентом 0,2 М пиридин-ацетат, рН 3,1 (400 мл) — 2 М пиридин-ацетат, рН 5,0 (400 мл). После 36 ч элюции буфер в резервуаре заменяли равным объемом 2 М пиридина, рН 8,5, и хроматографию продолжали еще 36 ч. Скорость элюции 12 мл/ч, фракции собирали по 2 мл. Для выявления пептидсодержащих фракций использовали пептидный анализатор АА-II (Technicon, Ирландия), отбирая для анализа из каждой фракции по 80 мкл. В качестве стандарта применяли

0,5 мМ раствор тетраглицина. Компоненты реакционной смеси готовили по методике [10].

*Модификация С-концевого фрагмента B. thuringiensis.* Обработку С-концевого фрагмента *B. thuringiensis* цитраконовым ангидридом проводили согласно методике [11]. 18 мл (3 мкмоль) бромцианового фрагмента растворяли в 7 мл 0,2 М раствора  $\text{NaHCO}_3$ , содержащего 6 М гуанидин-хлорид (рН 8,9). К реакционной смеси при охлаждении льдом добавляли с 20-минутными интервалами аликвоты цитраконового ангидрида по 50 мкл. Всего было введено в реакцию 250 мкл цитраконового ангидрида, что соответствует 100-кратному избытку по отношению к остаткам лизина. рН реакционной смеси поддерживали около 8,5 добавлением 5 М  $\text{NaOH}$ . По окончании цитраконилирования реакционную смесь подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 (колонка  $2,5 \times 60$  см), уравновешенном 0,05 М триэтиламмоний-карбонатным буфером (рН 8,2).

*Ограниченный гидролиз трипсином.* К 40 мл 0,05 М триэтиламмоний-карбонатного буфера, содержащего, по данным аминокислотного анализа, 6 мг (1 мкмоль) модифицированного цитраконовым ангидридом бромцианового фрагмента *B. thuringiensis*, добавляли 0,06 мг трипсина в 600 мкл того же буфера. Смесь инкубировали 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ , затем лиофилизировали.

Для отщепления цитраконовой кислоты от пептидов, полученных при ограниченном трипсиновом гидролизе, гидролизат растворяли в воде и устанавливали рН 2,2 концентрированной муравьиной кислотой, после чего раствор выдерживали 40 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем лиофилизировали.

Лиофильно высушенный гидролизат после децитраконилирования растворяли в 3 мл 0,1 М муравьиной кислоты и наносили на колонку ( $2,5 \times 90$  см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М муравьиной кислотой. Скорость элюции 18 мл/ч, фракции собирали по 3 мл.

*Анализ фракций.* Аликвоты фракций, полученных после ионообменной хроматографии пептидов, а также после разделения их на сефадексе G-25, упаривали до малого объема и хроматографировали в тонком слое целлюлозы в системе пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота (10:15:12:3). Из пептидных фракций, гомогенных при ТСХ, отбирали аликвоты, упаривали их досуха на роторном испарителе и гидролизировали 5,7 н.  $\text{HCl}$  24 ч при  $105^\circ\text{C}$ . Гидролизаты упаривали на роторном испарителе, аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе Durrum D-500 (США).

*Определение N-концевых аминокислот* [12]. 2–5 нмоль пептида в 50% пиридине переносили в ампулу ( $5 \times 60$  мм) и упаривали на роторном испарителе. К остатку добавляли 25 мкл 0,2 М раствора бикарбоната натрия и 25 мкл раствора дансилхлорида в ацетоне (2,5 мг/мл). Смесь инкубировали 40–45 мин при  $45^\circ\text{C}$ , затем упаривали, добавляли 150 мкл 5,7 н.  $\text{HCl}$  и гидролизировали в вакууме 18 ч при  $105^\circ\text{C}$ . При определении Dns-Ser и Dns-Thr гидролиз вели 6 ч, а при определении гидрофобных аминокислот — 40 ч. Гидролизаты упаривали в вакууме, остаток растворяли в ацетоне. Dns-Аминокислоты идентифицировали хроматографией на полиамидных пленках в трех системах растворителей в двух направлениях: муравьиная кислота — вода (0,16:9,84) — I направление; бензол — уксусная кислота (9:1) — II направление; этилацетат — уксусная кислота — метанол (10:0,5:0,5) — II направление.

*Определение последовательности аминокислот методом Эдмана в сочетании с дансилированием.* 50 нмоль пептида растворяли в 0,4 мл 50% пиридина, отбирали 0,04 мл на дансилирование, а к раствору пептида добавляли 0,04 мл 50% пиридина и 0,4 мл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине. Смесь инкубировали 1 ч при  $45^\circ\text{C}$ , затем прибавляли 0,4 мл воды и экстрагировали 3 раза бензолом, насыщенным водой. Слои разделяли центрифугированием. Водный раствор упаривали в вакууме при  $40^\circ\text{C}$ , остаток для удаления пиридина 2–3 раза упаривали с водой, затем к сухому остатку добавляли 0,4 мл трифторуксусной кислоты, раствор оставляли на 30 мин при  $45^\circ\text{C}$ , упаривали в вакууме. Далее к остатку добавляли 0,36 мл 50% пиридина и повторяли все стадии обработки.

**Определение С-концевых аминокислот.** Для приготовления рабочего раствора 20 мкл суспензии карбоксипептидазы А смешивали с 3 мл охлажденного раствора 0,1 М NaCl, к этому раствору при перемешивании добавляли 0,05 М NaOH до pH 10. Содержание карбоксипептидазы А в 1 мл раствора определяли, считая, что  $E_{280}^{0,1\%} = 2,5$ . 50 нмоль пептида растворяли в 0,5 мл 0,1 М триэтиламмоний-карбонатного буфера, pH 7,9, добавляли раствор карбоксипептидазы А (отношение фермент: субстрат=1:50) и смесь инкубировали при 35° С, отбирая пробы по 0,1 мл через 5, 15, 30 мин и 1 ч. Гидролиз прекращали, добавляя 20 мкл 5,7 н. HCl. Пробы лиофилизировали, аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе Durrum D-500. Для приготовления рабочего раствора карбоксипептидазы В 8 мкл карбоксипептидазы В смешивали с 2,95 мл 0,1 М триэтиламмоний-карбонатного буфера, pH 7,9, и 50 мкл 50 мМ раствора CoCl<sub>2</sub>. 50 нмоль пептида растворяли в 0,5 мл триэтиламмоний-карбонатного буфера, pH 7,9, и добавляли 0,1 мл раствора карбоксипептидазы В. Гидролиз вели 1 ч при 35° С, затем останавливали добавлением 20 мкл 5,7 н. HCl и смесь лиофилизировали.

Для определения С-концевых аминокислотных остатков в протеиназе *B. thuringiensis* 3 мг (100 нмоль) лиофилизованного белка растворяли в 100 мкл 80% фенола, выдерживали раствор 3 ч при 20° С, затем осаждали фермент 10-кратным объемом охлажденного ацетона и центрифугировали. Осадок промывали 3 раза охлажденным ацетоном, затем абс. эфиром и высушивали на воздухе. 3 мг денатурированного белка растворяли в 1 мл 0,01 н. NaOH, доводили значение pH до 7,5 добавлением 1 н. HCl и ингибировали протеиназу диизопропилфторфосфатом таким образом, чтобы концентрация реагента в растворе составляла 1 мМ. Затем протеиназу гидролизировали карбоксипептидазами А и В по методике, описанной выше.

Аналитический электрофорез пептидов вели 2 ч в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,6 (5 мл пиридина, 1 мл CH<sub>3</sub>COOH, 494 мл H<sub>2</sub>O) на бумаге Ватман 1 при 1000 В.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Загитъко О. П., Честухина Г. Г., Ревина Л. П., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 3, с. 383-389.
2. 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.
3. Епремян А. С., Честухина Г. Г., Азизбеян Р. Р., Нетыкса Е. М., Руденская Г. Н., Степанов В. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 920-929.
4. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова Н. Г., Куприянова Т. И., Хохлатова Ю. М., Усайте И. А., Логинова Л. Г., Тимохина Е. А. Биохимия, 1980, т. 45, № 10, с. 1871-1880.
5. Hausdorf G., Krüger K., Höhne W. E. Int. J. Peptide and Protein Res., 1980, v. 15, № 2, p. 420-425.
6. Честухина Г. Г., Епремян А. С., Гайда А. В., Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1649-1658.
7. Baudys M., Kostka V., Glüner K., Hausdorf G., Höhne W. E. Int. J. Peptide and Protein Res., 1982, v. 17, № 19, p. 32-39.
8. Markland F. E., Smith E. L. In: The Enzymes. N.Y.: Acad. Press, 1971, v. 3, p. 562.
9. Beardslee R. A., Zahnley J. C. Arch. Biochem. and Biophys., 1973, v. 158, № 2, p. 806-811.
10. Lin K. D., Deutsch H. F. Analyt. Biochem., 1973, v. 56, № 1, p. 155-164.
11. Atassi M. Z., Habeeb A. F. S. A. Methods Enzymol., 1972, v. 25, p. 546-552.
12. Hartley B. S. Biochem. J., 1970, v. 119, № 5, p. 805-822.

Поступила в редакцию  
18.I.1985



THIOL-DEPENDENT SERINE PROTEINASES. IV. PRIMARY STRUCTURE  
OF A *BACILLUS THURINGIENSIS* PROTEINASE C-TERMINAL FRAGMENT

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

*All-Union Institute of Genetics and Selection of Industrial  
Microorganisms, Moscow*

The primary structure of a C-terminal fragment of thiol-dependent serine proteinase produced by *Bacillus thuringiensis* has been determined. For this purpose, the fragment, containing 55 amino acid residues and isolated after cyanogen bromide cleavage of the enzyme, was submitted to tryptic hydrolysis. The following sequence adjacent to Met-222 was elucidated: Ala-Thr-Pro-His-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Leu-Ala-Asn-Gln-Gly-Tyr-Ser-Asn-Thr-Gln-Ile-Arg-Gln-Ile-Ile-Glu-Ser-Thr-Thr-Asp-Lys - Ile - Ser-Gly-Thr-Gly-Thr-Tyr-Trp-Lys-Asn-Gly-Arg-Val-Asn-Ala-Tyr-Lys-Ala-Val-Gln-Tyr-Ala - Lys. A structural homology was found of bacilli thiol-dependent serine proteinases and conventional subtilisins. For C-terminal fragments it proved to be 43% for the *B. thuringiensis* proteinase - subtilisin Carlsberg, and 39% for the proteinase - subtilisin BPN' pair. On the other hand, much closer structural resemblance (78%) of C-terminal sequences of the *B. thuringiensis* and the *Thermoactinomyces vulgaris* proteinases confirms an earlier suggestion that thiol-dependent serine proteinases form a separate subfamily within the family of evolutionary related subtilisins.