



УДК 577.112.5 : 591.145.2-546

ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
НЕЙРОТОКСИНА Os-1 ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО
ЧЕРНОГО СКОРПИОНА *ORTHOCHIRUS SCROBICULOSUS*

Потапенко Н. А., Волкова Т. М., Гарсия А. Ф.,
Галкина Т. Г., Дулубова И. Е., Гришин Е. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Определена аминокислотная последовательность нейротоксина Os-1 из яда среднеазиатского черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*, обладающего высокой токсичностью по отношению к млекопитающим. Изучены продукты расщепления токсина трипсином, химотрипсином и бромцианом. Токсин состоит из 66 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями.

Нейротоксины из ядов скорпионов, действующие на млекопитающих, являются незаменимыми инструментами исследования натриевых каналов аксональной мембраны [1, 2]. Они способны воздействовать на процессы активации или инактивации этих мембранных транспортных систем [3]. Четыре нейротоксина, вызывающих замедление скорости инактивации натриевого канала, были выделены из яда среднеазиатского черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* [4]. Было показано, что токсин Os-3 из этого яда обладает высокой степенью структурной гомологии с токсинами скорпиона *Vuthus eurus* [4]. Настоящая работа посвящена исследованию аминокислотной последовательности токсина для млекопитающих Os-1 из яда скорпиона *O. scrobiculosus*.

Токсин Os-1 интересен тем, что обладает самой высокой токсической активностью среди компонентов яда *O. scrobiculosus*, его LD₅₀ составляет 107,5 мкг/кг веса мыши [4]. Кроме того, отличительной особенностью Os-1 является наличие в его составе остатка метионина. Присутствие метионина характерно только для инсектотоксинов скорпионов [5]; среди токсинов для млекопитающих к настоящему времени только в одном (из яда *Tylius serrulatus*) обнаружен метионин [6].

Ранее было описано выделение токсина Os-1 из цельного яда [4]. Токсин был получен в две стадии: гель-хроматография цельного яда на последовательно соединенных колонках с сефадексом G-50 и биогелем P-10 (две колонки), затем равновесная хроматография одной из токсичных фракций на ДЕАЕ-сефадексе А-50. Была доказана гомогенность полученного полипептида, определен его аминокислотный состав.}

Поскольку Os-1 содержит 8 остатков цистеина и при этом в нем нет свободных сульфгидрильных групп, для проведения дальнейших структурных работ осуществлялось восстановление дисульфидных связей с помощью β-меркаптоэтанола и карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных групп.

Первичное расщепление полипептидной цепи СМ-нейротоксина Os-1 проводилось трипсином. После разделения гидролизата ВЭЖХ с обратной фазой в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 5,7) в градиенте ацетонитрила было получено 6 индивидуальных пептидных фрагментов (рис. 1). Для них был определен аминокислотный состав и показано, что они перекрывают всю полипептидную цепь токсина, так как в сумме, как и интактный токсин, содержат 66 аминокислотных остатков (табл. 1). Структура пептидов Т-1 — Т-5 устанавливалась методом Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде Dns-производных [7, 8].

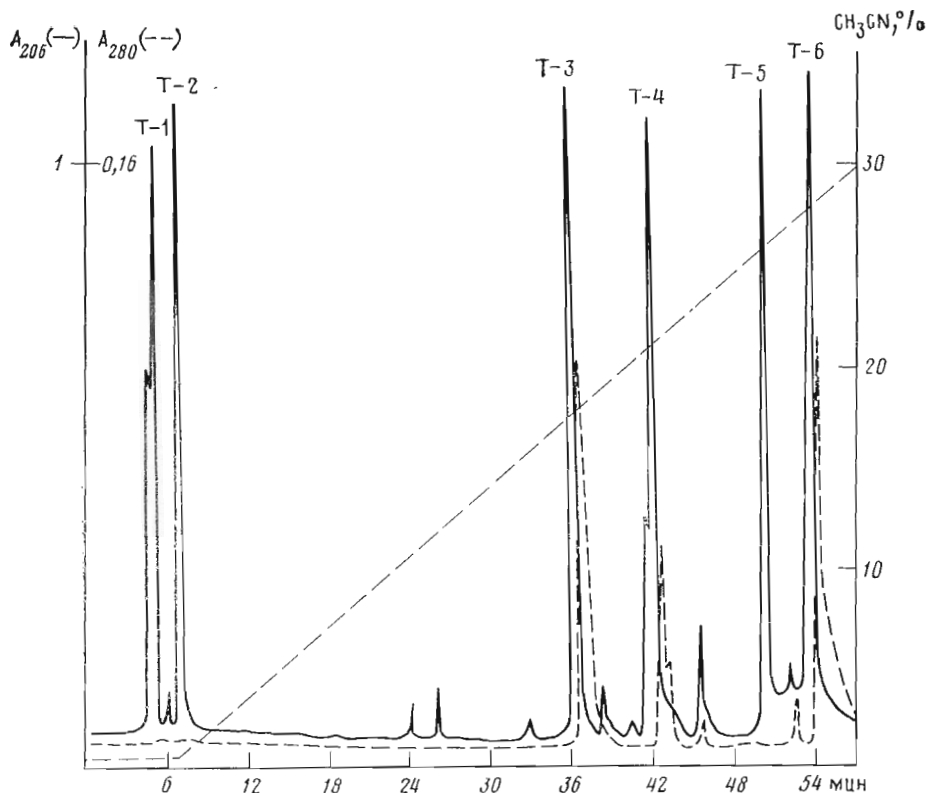


Рис. 1. Разделение триптических пептидов СМ-токсина Os-1 ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS C₁₈, 5 мкм (4,6 × 250 мм) в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 5,7) в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин

Одновременно определялись дикарбоновые аминокислоты и их амиды в виде фенилтиогидантоиновых (Pth) производных [9]. С-Концевые последовательности пептидов устанавливались с помощью карбоксипептидаз А и В [10]. Таким образом удалось получить полную аминокислотную последовательность пептидов Т-1 (она совпадала с N-концевой последовательностью пептидов Т-2, Т-3, Т-4, Т-5, Т-6).

Таблица 1

Аминокислотный состав СМ-токсина Os-1 и его триптических пептидов

Аминокислота	Os-1	Т-1	Т-2	Т-3	Т-4	Т-5	Т-6
Cys(Cm)	7,42(8)		0,45(1)	0,51(1)	1,97(4)		1,37(2)
Asp	8,3(8)			0,61(1)	2,16(4)	0,89(1)	1,68(2)
Thr	2,92(3)			1,02(2)	0,72(1)		
Ser	2,10(2)			0,98(2)			
Glu	3,51(3)	0,82(1)		0,70(1)	0,83(1)		
Pro	4,02(4)				0,91(1)	0,77(1)	1,71(2)
Gly	6,38(6)			1,21(2)	1,80(3)		0,85(1)
Ala	3,21(3)			0,63(1)		0,79(1)	1,66(2)
Val	2,91(3)				0,83(2)		0,71(1)
Met	0,83(1)			0,46(1)			
Pe	1,78(2)				0,59(1)		0,69(1)
Leu	4,49(5)				1,02(3)		0,79(1)
Tyr	6,72(7)		0,64(1)	0,42(1)	1,41(3)		1,46(2)
His	2,01(2)				0,99(2)		
Lys	5,07(5)			0,52(1)	0,62(1)	0,71(1)	1,60(2)
Arg	0,99(1)	0,75(1)					
Trp*	(3)			(1)		(1)	(1)
Всего	66	2	2	14	26	5	17
N-Концевая	Glu	Glu	Cys(Cm)	Asn	Asp	Trp	Trp
Выход, %		14	20	32	40	24	40

* Trp определяли спектрофотометрически.

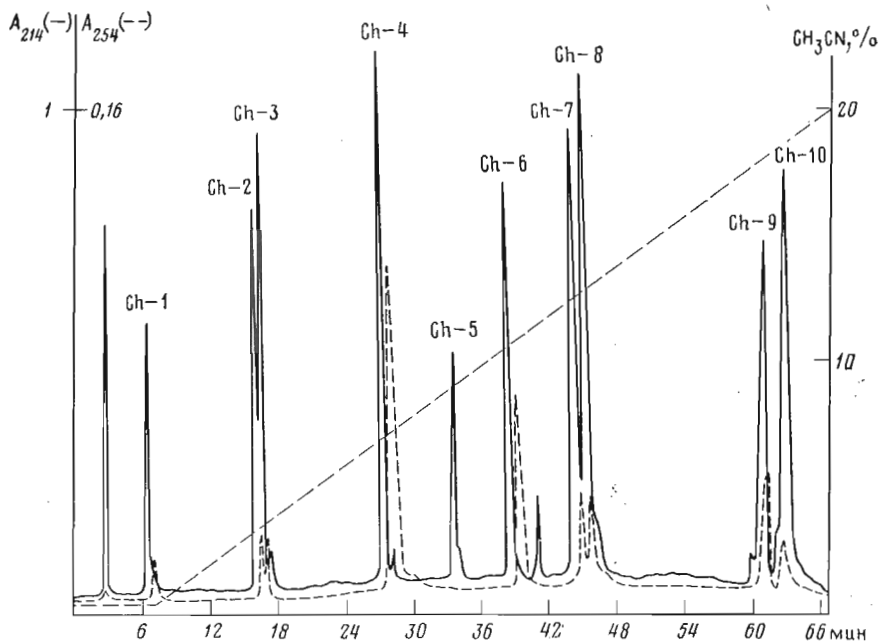


Рис. 2. Разделение химотриптических пептидов СМ-токсина Os-1 ВЭЖХ (условия как на рис. 1)

тельностью токсина), Т-2, Т-5 и частичную пептидов Т-3 и Т-4 (табл. 2). Т-2 является С-концевым фрагментом, так как не содержит остатков Lys и Arg.

Для установления полной аминокислотной последовательности пептида Т-3 были использованы данные по его N-концевой последовательности, деградации методом Эдмана смеси химотриптических фрагментов этого пептида (табл. 3), а также данные о С-концевой последовательности, полученные с помощью карбоксипептидаз (табл. 2). Полная структура пептида Т-6 была определена с помощью газофазного секвенатора.

Для реконструкции молекулы токсина Os-1 был проведен его химотриптический гидролиз. Разделение полученных фрагментов осуществлялось ВЭЖХ с обращенной фазой. В результате было выделено 10 индивидуальных пептидов (рис. 2), содержащих в сумме 66 аминокислотных остатков (табл. 4). Методом Эдмана была изучена полная аминокислотная по-

Таблица 2

Аминокислотная последовательность триптических пептидов СМ-токсина Os-1

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Glu-Arg
T-2	Cys(Cm)-Tyr
T-3	Asn-Gly-Ala-Thr-Ser-Gly-Ser-Tyr-Cys(Cm)-(Glx; Trp)-Met-Thr-Lys
T-4	Asp-Gly-Tyr-Ile-Val-Gln-Leu-His-Asn-Cys(Cm)-Val-Tyr-His-Cys(Cm)-(Gly ₂ ; Asx ₂ ; Pro; Tyr; Leu ₂ ; Cys(Cm) ₂)-Thr-Lys
T-5	Trp-Leu-Asp-Pro-Lys
T-6	Trp-Gly-Asn-Ala-Cys(Cm)-Tyr-Cys(Cm)-Tyr-Ala-Leu-Pro-Asp-Lys-Val-Pro-Ile-Lys

Примечание. Здесь и далее \rightarrow — стадии деградации по Эдману, \leftarrow — отщеплено карбоксипептидазами.

Определение аминокислотной последовательности триптического пептида Т-3
постадийной деградацией по Эдману смеси его химотриптических фрагментов *

Стадии деградации	1	2	3	4	5	6	7	8
Определяемые аминокислоты	Asn Cys (Cm) Met	Gly Gln Thr	Ala Trp Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Tyr

* Выведенная полная структура пептида Т-3 (стрелками отмечены места гидролиза химотрипсином) Asn-Gly-Ala-Thr-Ser-Gly-Ser-Tyr-Cys(Cm)-Gln-Trp-Met-Thr-Lys.

следовательность пептидов Ch-1—Ch-4, Ch-6—Ch-10 и частичная Ch-5 (табл. 5).

Таким образом, изучение продуктов триптического и химотриптического гидролиза СМ-токсина Os-1 не позволило однозначно локализовать положение в полипептидной цепи фрагментов Ch-7 и Ch-5. Для получения недостающей информации было проведено расщепление молекулы токсина по остатку метионина с помощью бромциана. При этом оказалось, что связь Met⁴⁰-Thr⁴¹ практически не расщепляется в 70% муравьиной кислоте. Поэтому реакцию проводили в 70% трифторуксусной кислоте. Методом ВЭЖХ с обращенной фазой были выделены 4 индивидуальных пептида (рис. 3), причем пептид В-1 образовался из пептида В-1 + В-2 в результате частичного расщепления связи Asp⁶²-Pro⁶³ (табл. 6). Методом Эдмана была установлена аминокислотная последовательность пептида В-1 и N-концевая последовательность пептида В-2 (табл. 7).

С помощью газофазного секвенатора был осуществлен анализ последовательности первых 24 остатков N-концевого фрагмента В-3 (табл. 7). Аминокислотные остатки в положениях 2, 9, 15, 16, 20 были идентифици-

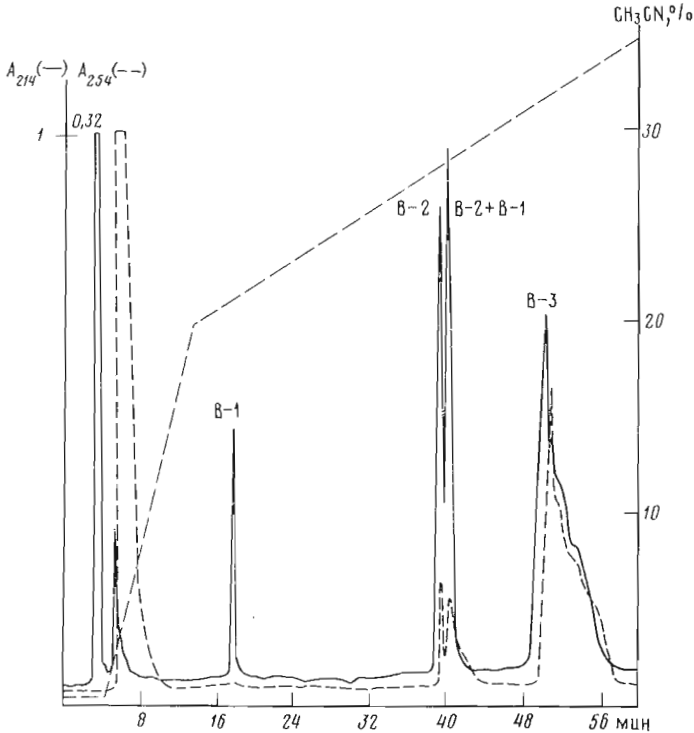


Рис. 3. Разделение бромциановых пептидов СМ-токсина Os-1 ВЭЖХ на колонке Silasorb C₈, 7 мкм (4,6 × 250 мм) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин

Аминокислотный состав химогрипических пептидов СМ-гоксина Os-1

Аминокислота	Ch-1	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-5	Ch-6	Ch-7	Ch-8	Ch-9	Ch-10
Cys(Cm)	0,75(1)		0,82(1)	0,68(1)	1,54(2)		0,82(1)	0,85(1)		0,74(1)
Asp		1,23(1)	1,21(1)		2,31(2)	0,93(1)	1,20(1)	1,31(1)	1,39(1)	1,28(1)
Thr					1,96(2)					
Ser					2,37(2)					
Glu		1,12(1)		1,27(1)			1,04(1)	1,14(1)	2,41(2)	1,26(1)
Pro		1,31(1)	1,22(1)		3,29(3)		1,25(1)		1,29(1)	
Gly			1,10(1)		1,12(1)			1,84(2)	1,01(1)	
Ala						0,79(1)				
Val										
Met										
Ile								0,76(1)	0,82(1)	
Leu					1,07(1)		0,92(1)	0,92(1)	0,91(1)	0,99(1)
Tyr	1,02(1)	0,92(1)	0,93(1)		0,92(1)		0,84(1)	1,01(1)		0,85(1)
His							0,97(1)	1,06(1)		
Lys										
Arg		1,00(1)			1,01(1)	1,12(1)			2,04(2)	1,04(1)
Trp *						(1)			(1)	
N-Концевая	Cys(Cm)	Glu	Gly	Cys(Cm)	Cys(Cm)	Met	His	Ile	Ala	Leu
Всего	2	5	5	3	15	4	7	9	10	6
Выход, %	31	44	39	32	23	29	43	48	34	38

* Trp определяли спектрофотометрически.

Аминокислотная последовательность химотриптических пептидов CM-токсина Os-1

Пептид	Аминокислотная последовательность
Ch-1	<u>Cys(Cm)-Tyr</u>
Ch-2	<u>Glu-Arg-Asp-Gly-Tyr</u>
Ch-3	<u>Gly-Asn-Ala-Cys(Cm)-Tyr</u>
Ch-4	<u>Cys(Cm)-Gln-Trp</u>
Ch-5	<u>Cys(Cm)-Asn-Gly-Leu-Cys(Cm)-Thr-Lys-Asn-Gly-(Ala; Thr; Ser₂; Gly;)-Tyr</u>
Ch-6	<u>Met-Thr-Lys-Trp</u>
Ch-7	<u>His-Cys(Cm)-Gly-Leu-Asn-Pro-Tyr</u>
Ch-8	<u>Ile-Val-Gln-Leu-His-Asn-Cys(Cm)-Val-Tyr</u>
Ch-9	<u>Ala-Leu-Pro-Asp-Lys-Val-Pro-Ile-Lys-Trp</u>
Ch-10	<u>Leu-Asp-Pro-Lys-Cys(Cm)-Tyr</u>

Таблица 5

Аминокислотный состав бромциановых пептидов CM-токсина Os-1

Аминокислота	B-1	B-2	B-2+B-1	B-3
Cys(Cm)	0,83(1)	1,84(2)	2,38(3)	4,23(5)
Asp		3,15(3)	3,29(3)	5,56(5)
Thr		0,96(1)	0,85(1)	1,82(2)
Ser				2,31(2)
Glu				3,27(3)
Pro	1,22(1)	2,31(2)	2,92(3)	1,29(1)
Gly		1,36(1)	1,24(1)	5,14(5)
Ala		2,18(2)	2,16(2)	1,29(1)
Val		0,98(1)	0,84(1)	1,88(2)
HSe				(1)
Ile		0,83(1)	0,72(1)	0,88(1)
Leu		2,02(2)	1,97(2)	2,76(3)
Tyr	0,97(1)	1,85(2)	2,85(3)	3,74(4)
His				1,65(2)
Lys	1,08(1)	3,07(3)	4,11(4)	0,91(1)
Arg				1,05(1)
Trp		(2)	(2)	(1)
N-Концевая	Pro	Thr	Thr	Glu
Всего	4	22	26	40
Выход, %	12	23	16	23

рованы с привлечением данных о последовательности пептидов химотриптического и триптического гидролизом. Полученные данные позволили установить полную аминокислотную последовательность токсина Os-1 (рис. 4), который состоит из 66 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями.

При сравнении токсинов Os-1 и Os-3 [4] можно выделить по крайней мере 37 инвариантных остатков, а структурная гомология с токсинами из яда скорпиона *B. eurus* [11, 12] достигает 50% (рис. 5). Серьезные структурные отличия обнаруживаются у исследуемого токсина на участке полипептидной цепи 39—43, где и расположен единственный остаток метионина. Возможно, именно это обуславливает высокую токсическую активность токсина Os-1.

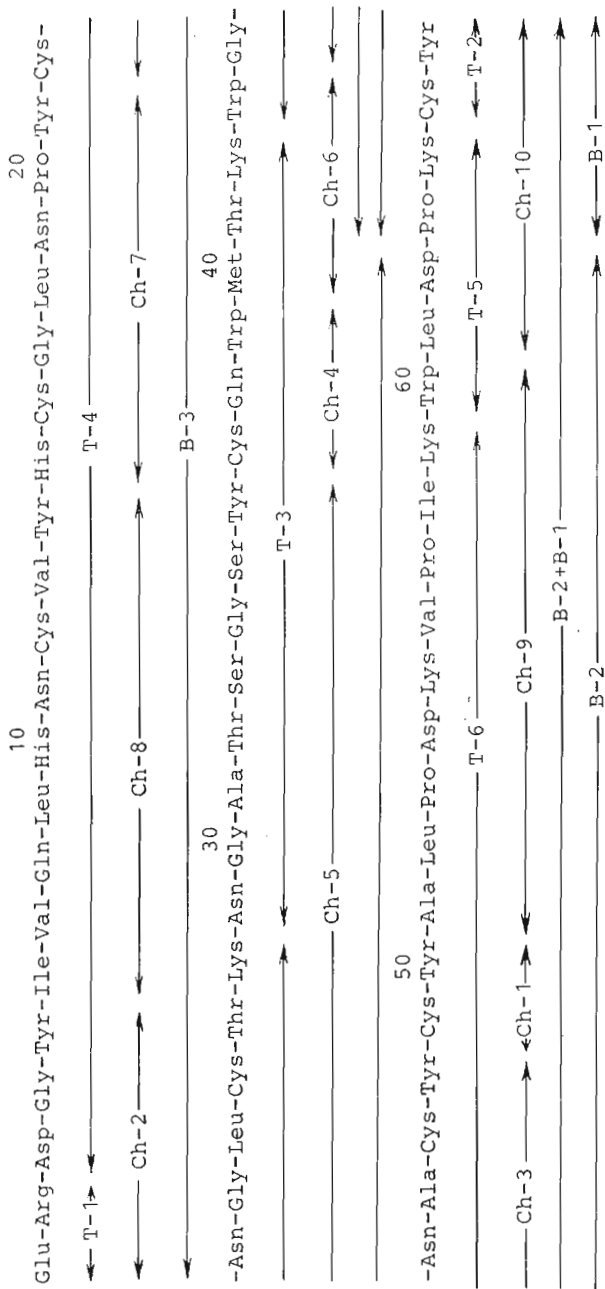


Рис. 4. Полная аминокислотная последовательность нейротоксина Os-1 из яда среднеазиатского скорпиона *O. scrobiculatus*

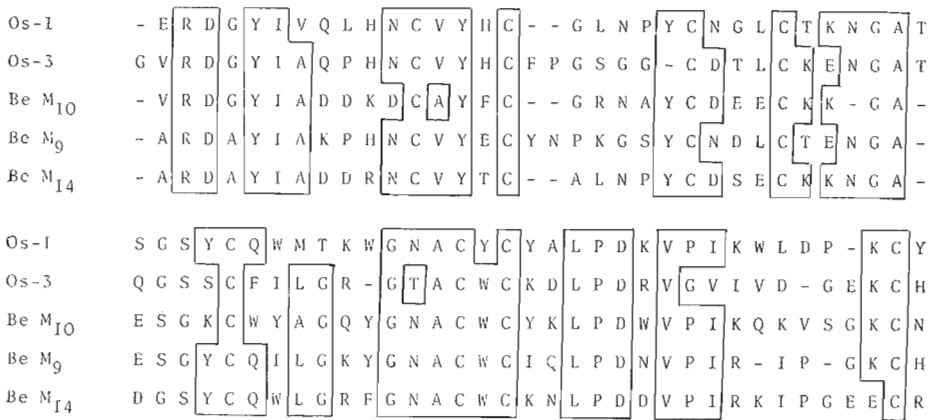


Рис. 5. Аминокислотные последовательности токсинов *O. scrobiculosus* и токсинов *B. eirps* в однобуквенном коде. В рамки взяты инвариантные остатки. Прочерк означает делецию

Экспериментальная часть

В работе использовали лиофильно высушенный цельный яд скорпиона *O. scrobiculosus* отечественного производства, ТРСК-трипсин, химотрипсин (Worthington, США), карбоксипептидазы А и В (Boehringer, ФРГ), биогель Р-6 (Bio-Rad, США). Разделение пептидов ВЭЖХ с обращенной фазой проводили на хроматографе Altex с проточными спектрофотометрами: модель 332 с объемом ячейки 8 мкл (Altex, США) и Altex 160 (Beckman, США), который измерял поглощение при 214 нм. Использовали колонки Silasorb C₈ (А) и Ultrasphere ODS C₁₈ (Б).

Аминокислотный состав токсина и пептидов определяли по стандартной методике [5] на анализаторе аминокислот D-500 (Durrum, США). Содержание остатков триптофана определяли спектрофотометрически [13], а также с помощью анализатора после гидролиза 4 н.метансульфоновой кислотой [14].

Карбоксиметилирование токсина Os-1 (250 нмоль) после восстановления β-меркаптоэтанолом осуществляли иодуксусной кислотой по известной методике [15]. Модифицированный токсин обессоливали на колонке (1,6 × 90 см) с биогелем Р-6. Элюцию проводили 5% уксусной кислотой со скоростью 12 мл/ч.

Триптический гидролиз СМ-токсина Os-1. 80 нмоль токсина растворяли в 800 мкл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,3) и обрабатывали трипсином 4 ч при 37° С, отношение фермент — субстрат составляло 1 : 50. Гидролизат подкисляли и упаривали. Фракционирование триптических пептидов осуществляли ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Б (рис. 1).

Химотриптический гидролиз СМ-токсина Os-1. К 80 нмоль токсина, растворенного в 800 мкл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,3), добавляли химотрип-

Таблица 7

Аминокислотная последовательность бромциановых пептидов СМ-токсина Os-1

Пептид	Аминокислотная последовательность
В-1	Pro-Lys-Cys(Cm)-Tyr
В-2	Thr-Lys-Trp-Gly-Asn-(Ala ₂ , Cys(Cm) ₂ , Tyr ₂ , Leu ₂ , Pro ₂ , Asx ₂ , Lys ₂ , Val, Ile, Trp)
В-3	Glu-Xaa-Asp-Gly-Tyr-Ile-Val-Gln-Xaa-His-Asn-Cys(Cm)-Val-Tyr-Xaa-Xaa-Gly-Leu-Asn-Xaa-Tyr-Cys(Cm)-Gly-Leu-(Asx ₂ , Gly ₂ , Cys(Cm) ₂ , Thr ₂ , Lys, Ala, Ser ₂ , Tyr, Glx, Trp)-HSe

син в соотношении фермент — субстрат 1 : 100, выдерживали 4 ч при 37° С и гидролизат упаривали. Разделение гидролизата проводили ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Б (рис. 2).

Расщепление токсина Os-1 с помощью бромциана (модифицированная методика [16]). 10 нмоль СМ-токсина Os-1 растворяли в 100 мкл 70% трифторуксусной кислоты и добавляли 200-кратный молярный избыток бромциана. Реакционную смесь выдерживали 24 ч в темноте при 20° С, затем разбавляли водой и упаривали несколько раз до полного удаления реагента. Полученные пептиды разделяли ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке А (рис. 3).

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали методом Эдмана в дансильном варианте по описанным ранее методикам [7, 8]. При этом дикарбоновые кислоты и их амиды идентифицировали в виде Pth-производных [9].

С-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли при помощи карбоксипептидаз А и В при рН 8,5 [10]. Анализ отщепленных аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе, а также идентификацией в виде Dns-производных.

Структуру триптического пептида Т-6 и N-концевую последовательность бромцианового пептида В-3 определяли на газофазном автоматическом секвенаторе Applied Biosystems (модель 470А). Продукты отщепления идентифицировали ВЭЖХ с обращенной фазой в 25 мМ трифторацетатном буфере (рН 5,4) в градиенте концентрации ацетонитрила на колонке В (4,6 × 250 мм) и в изократном режиме на колонке Silasorb C₈ в том же буфере.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, ценные советы и замечания, а также И. В. Назимову за определение аминокислотных последовательностей пептидов на газофазном секвенаторе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rochat H., Darbon H., Jover E., Martin M.-F., Babbito J., Couraud F. J. *Physiol.*, Paris, 1984, v. 73, № 4, p. 334—337.
2. Catterall W. A., Hartsborm R. P., Beneski D. A. *Toxicon*, 1982, v. 20, № 1, p. 27—4).
3. Овчинников Ю. А., Grishin E. V. *Trends Biochem. Sci.*, 1982, v. 7, № 1, p. 26—28.
4. Волкова Т. М., Дулубова И. Е., Тележельская И. Н., Гришин Е. В. *Биоорг. химия*, 1934, т. 10, № 8, с. 1100—1108.
5. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 155—164.
6. Pössani L. D., Alagón A. C., Fletcher P. L., Jr., Erikson B. W. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, v. 180, p. 394—403.
7. Gray W. R. *Methods in Enzymol.*, 1967, v. 11, p. 469—475.
8. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикунина Е. Б., Виноградова Е. И. *Биохимия*, 1972, т. 37, № 2, с. 410—413.
9. Аласов Ю. Б., Мэтуз Л. И., Стэнгервиц О. А., Винокуров Л. М. *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1301—1313.
10. Ambler R. P. *Methods in Enzymol.*, 1972, v. 25, p. 143—154.
11. Волкова Т. М., Гарсия А. Ф., Тележельская И. Н., Потанико Н. А., Гришин Е. В. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 1, с. 1445—1456.
12. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Шахпаров М. И., Казаков В. К. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 714—723.
13. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Ташигузamedов Б. А., Атакузиев Б. У. *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 450—461.
14. Moore S. In: *Chemistry and biology of peptides*/Ed. Meienhofer J. Michigan: Ann Arbor Publ., 1972, p. 629—653.
15. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 2, p. 622—627.
16. Brett M., Findley J. B. C. *Biochem. J.*, 1983, v. 211, № 3, p. 661—670.

Поступила в редакцию
21.X.1985

TOTAL AMINO ACID SEQUENCE OF NEUROTOXIN Os-1 FROM THE VENOM
OF THE CENTRAL ASIAN SCORPION *ORTHOCHIRUS SCROBICULOSUS*

POTAPENKO N. A., VOLKOVA T. M., GARSIA A. F., GALKINA T. G.,
DULUBOWA I. E., GRISHIN E. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The neurotoxin Os-1 from the venom of the Central Asian scorpion *Orthochirus scrobiculosus* possesses a high paralytic activity against mice. This neurotoxin was subjected to tryptic, chymotryptic and BrCN cleavages and its total amino acid sequence was established. It was shown that neurotoxin Os-1 consists of 66 amino acid residues and contains four disulfide bonds.