



УДК 577.152.34'236'1 : 577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АСПЕРГИЛЛОПЕПСИНА А —
АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ
ИЗ *ASPERGILLUS AWAMORI*

IV*. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТА

*Остославская В. И., Ревина Л. П., Котлова Е. К.,
Сурова Н. А., Левин Е. Д., Тиможина Е. А.,
Степанов В. М.*

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

Определено строение полипептидной цепи аспергиллопепсина А — аспартильной протеиназы микроскопического гриба *Aspergillus awamori*, насчитывающей 320 аминокислотных остатков. Используются результаты анализа структуры пептидов, полученных из триптического, химотриптического, эластазного и пептического гидролизатов. В некоторых случаях расстановку пептидных фрагментов в последовательности аспергиллопепсина А проводили с привлечением данных о гомологии аспартильных протеиназ.

Степень гомологии аспергиллопепсина А с пенициллопепсином составляет 61%, а с пепсином свиньи — 26%. Выявлено значительное совпадение аминокислотных последовательностей, окружающих функционально важные остатки аспарагиновой кислоты, находящиеся в положении 32 и 215 **.

Предполагается большое сходство пространственных структур грибных протеиназ — аспергиллопепсина А и пенициллопепсина, а также структур аспергиллопепсина А и пепсина животных.

Настоящее сообщение завершает публикацию данных о первичной структуре аспергиллопепсина А — аспартильной протеиназы микроскопического гриба *Aspergillus awamori* (рис. 1). В предыдущих сообщениях [1—3] были изложены результаты изучения пептидов, образовавшихся при гидролизе этого фермента или его фрагментов трипсином, химотрипсином и эластазой.

В связи с тем что информация о строении пептидных фрагментов, полученных ранее, оказалась недостаточной, были предприняты более длительной (6-часовой) гидролиз трипсином и гидролиз пепсином. Дополнительно были выделены пептиды, полученные при действии эластазы на триптические фрагменты T_2 -1-2 [1, 2] и T_3O ***. Из термолизинового гидролизата аспергиллопепсина А, модифицированного хлоридом *n*-нитрофенил-дiazония [4], были выделены некоторые термолизиновые пептиды.

Ранее было показано, что при 2-часовом гидролизе трипсином образуется фрагмент T_1O [2], состоящий из 128 аминокислотных остатков. В 6-часовом гидролизе трипсином через 2 ч отделяли фрагмент T_3O , соответствующий фрагменту T_1O , и продолжали гидролиз еще 4 ч. Пептиды разделяли на катионообменной смоле Chromobeads в градиенте пиридин-ацетатного буфера [2] и получили 23 фракции (T_3 1 — T_3 23) **** (рис. 2). Очистку пептидов проводили хроматографией и электрофорезом на бумаге, гель-хроматографией на сефадексе G-50sf (рис. 3). Последовательность пептидов определяли методом Эдмана в сочетании с дансилированием [2], а также с помощью гидролиза карбоксипептидазами А и В. В отдельных случаях С-концевые аминокислоты идентифицировали, используя гидролиз с последующим дансилированием [2].

* Сообщение III см. [1].

** Здесь и далее нумерация остатков дается по аминокислотной последовательности пепсина свиньи.

*** T_1 — 2-часовой, T_2 — 4-часовой, T_3 — 6-часовой гидролиз трипсином.

**** При растворении ферментативных гидролизатов (для нанесения на колонку) выпадал осадок. После отделения осадка раствор хроматографировали, а осадок растворяли отдельно и также фракционировали. Полученные при этом фракции имеют индекс «ОС», указывающий на «происхождение» фракции из осадка.

Пептиды, образовавшиеся в результате 6-часового триптического гидролиза аспергиллопепсина А

Пептид	Аминокислотная последовательность *	Участок полипептидной цепи
T ₃ (OC)-4-1	Ser-Gln-Tyr-Val-Val-Phe ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	309-314
T ₃ 4-1-4	Ala-Gln-Thr-Thr-Phe-Phe-Asp-Thr-Val-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	136-145
T ₃ 8-2	Asn-Ile-Ser-Tyr-Gly-Asn-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser-Gly-Asp- Val-Tyr-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	72-86
T ₃ 8-3	Ala-Gln-Thr-Thr-Phe ↘ ↘ ↘ ↘	136-140
T ₃ 9-1-2	Asp-Ser-Gln-Gly-Pro-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	315-320
T ₃ 9-2	Ser-Ser-Ile-Asn-Thr-Val-Gln-Pro-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	126-135
T ₃ 9-3-2	Tyr-Thr-Gly-Ser-Ile-Thr-Tyr ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	175-181
T ₃ 11-3	Asp-Thr-Val-Lys ↘ ↘ ↘ ↘	142-145
T ₃ 11-4	Ser-Gln-Leu-Asn-Ser-Pro-Leu-Phe ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	146-153
T ₃ 12-1	Thr-Trp-Asn-Ile-Ser-Tyr-Gly-Asn-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser- Gly-Asp-Val-Tyr-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	70-86
T ₃ 12-1-Th4-1	Ile-Ser-Tyr-Gly-Asn-Gly-Ser-Ser ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	73-80
T ₃ 12-2	Asp-Phe-Gly-Tyr-Ile-Asx-Asx-Ser-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	166-174
T ₃ 13-2	Gly-Ser-Ala-Val-Thr-Thr-Pro-Gln-Asn-Asn-Asp-Glu-Glu- Tyr-Leu-Thr-Pro-Val-Thr-Val-Gly-Lys ↘	3-22
T ₃ 16-4	Phe-Ala-Val-Gln-Leu-Lys ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	153-158
T ₃ 17-1	Ala-Ser-Lys ↘ ↘ ↘	104-106
T ₃ 19-2	Leu-Ser-Gly-Tyr-Thr-Trp ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	66-71

* ↘ — последовательность, определенная методом Эдмана в дансильной модификации; с помощью карбоксипептидаз А (↙) и В (↖).

Исследование пептидов, образующихся при 6-часовом гидролизе трипсином, позволило определить аминокислотную последовательность аспергиллопепсина А на участке 66—86 (рис. 1), а также подтвердить ряд ранее установленных последовательностей. В табл. 1 показаны участки последовательности аспергиллопепсина А, занимаемые соответствующими пептидами. Некоторые пептиды образовались в результате неспецифического расщепления трипсином по остаткам триптофана, тирозина и фенилаланина.

Пептид T₃12-1 (табл. 1) выделили из фракции T₃12 хроматографией на сефадексе G-50sf в 6 М мочеvine в 0,05 М триэтиламин-карбонатном буфере, pH 8,5. Он состоит из 18 аминокислотных остатков и содержит остаток триптофана, определенный гидролизом с метансульфоново́й кислотой. Пептид гидролизовали термолизом по связям Asn³-Ile⁴ и Ser¹¹-Ala¹². Один из образовавшихся при этом пептидов — восьмичленный пептид T₃12-1-Th4-1 — очистили хроматографией на бумаге, последовательность определили методом Эдмана в дансильном варианте.

Пептид T₃8-2 (табл. 1) выделили из фракции T₃8 хроматографией на бумаге. Он состоит из 16 аминокислотных остатков и не содержит остатка триптофана. Сравнение аминокислотного состава и последовательностей

⁻² 1 ¹⁰
 P H-Ala-Leu-Ile-Gly-Asp-Glu-Pro-Leu-Glu-Asn-Tyr-Leu-Asp-Thr-Glu-Tyr-Phe-Gly-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly-Ihr-Pro-
 PP H-Ala-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Thr-Asn-Thr-Pro-Thr-Ala-Asn-Asp-Glu-Glu-Tyr-Ile-Thr-Pro-Val-Thr-Ile-Gly-Gly-Thr-
 APA H-Ser=Lys-Gly-Ser-Ala-Val-Thr-Thy-Pro-Gln-Asn-Asp-Glu-Glu-Tyr-Leu-Thr-Pro-Val-Thr-Val-Gly-Lys-Ser-
 C10-2 53

³⁰ ⁴⁰
 P Ala-Gln-Asp-Phe-Thr-Val-Ile-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser-Asn-Leu-Trp-Val-Pro-Ser-Val-Tyr-Cys-Ser-Ser-Leu-Ala-
 TP Thr-Asn-Leu-Asn-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala-Asp-Leu-Trp-Val-Phe-Ser-Thr-Glu-Leu-Pro-Ala-Ser-Gln-
 APA Thr-His-Leu-Asp-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala-Asp-Leu-Trp-Val-Phe-Ser-Asp-Glu-Leu-Pro-Ser-Ser-Glu-
 C10-2 C26-1 C23-3
 T3

Рис. 1. Первичные структуры аспергиллопептина А (АРА), пептина свиный (Р) и пенициллопептина (РР). Т, С, Е, Р, Th — обозначения, пептидов, полученных при гидролизе аспергиллопептина А трипсином, химотрипсином, эластазой, пепсином и термолитином соответственно

⁵⁰
 P Cys-Ser-Asp-His-Asn-Gln-Phe-Asn-Pro-Asp-Ser-Asp-Ser-Thr-Phe-Glu-Ala-Thr-Ser-Gln-Glu-Leu-Ser-Ile-Thr-Tyr-
⁶⁰
 PP Gln-Ser-Gly-His-Ser-Val-Tyr-Asn-Pro-Ser-Ala-Thr-Gly- - Lys-Glu-Leu-Ser-Gly-Tyr-Thr-Trp-Ser-Ile-Ser-Tyr-
 APA Arg-Thr-Gly-His-Asn-Val-Tyr-Thr-Pro-Ser-Ser-Ala-Thr-Lys- - Leu-Ser-Gly-Tyr-Thr-Trp-Asn-Ile-Ser-Tyr-
 _____ C23-3 _____ C28-2 _____
 T₃ _____ T₂5-9 _____ C15-1 _____ T₃19-2 _____ T₃8-2 _____
 _____ T₃12-1 _____

⁸⁰
 P Gly-Thr-Gly-Ser-Met- - Thr-Gly-Ile-Leu-Gly-Tyr-Asp-Thr-Val-Gln-Val-Gly-Gly-Ile-Ser-Asp-Thr-Asn-Gln-Ile-
⁹⁰
 PP Gly-Asp-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser-Gly-Asn-Val-Phe-Thr-Asp-Ser-Val-Thr-Val-Gly-Gly-Val-Thr-Ala-His-Gly-Gln-Ala-
 APA Gly-Asn-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser-Gly-Asp-Val-Tyr-Arg-Asp-Thr-Val-Thr-Val-Gly-Gly-Val-Thr-Asn-Thr-Lys-Glu-Ala-
 _____ C13-11 _____ C25-3 _____
 T₃8-2 _____ T₂5-21 _____ T₂5-1-3-1 _____
 T₃12-1 _____ Th34-1 _____

	110	120
P	Phe-Gly-Leu-Ser-Glu-Thr-Glu-Pro-Gly-Ser-Phe-Leu-Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe-Asp-Gly-Ile-Leu-Gly-Leu-Ala-Tyr-Pro-	
PP	Val-Gln-Ala-Ala-Gln-Gln-Ile-Ser-Ala-Gln-Phe-Gln-Gln-Asp-Thr-Asn-Asn-Asp-Gly-Leu-Leu-Gly-Leu-Ala-Phe-Ser-	
APA	Val-Gln-Ala-Ala-Ser-Lys-Ile (Ser, Ser, Glu) Phe-Glx-Val-Asx-Gly-Gly-Glx-Asx-Ser-Gly-Ala-Glx-Ala-Tyr-Ser-	C7-31
	_____ C25-3 _____ C1-4 _____	
	_____ T ₂ 5-1-3-1 _____	C3-6-E1
	_____ T ₃ 17-1-1 _____	T ₂ 5-4-1
	130	140
P	Ser-Ile-Ser-Ala-Ser-Gly-Ala-Thr-Pro-Val-Phe-Asp-Asn-Leu-Tyr-Asp-Gln-Gly-Leu-Val-Ser-Gln-Asp-Leu-Phe-Ser-	
PP	Ser-Ile-Asn- - Thr-Val-Gln-Pro-Gln-Ser-Gln-Thr-Phe-Phe-Asp-Thr-Val-Lys-Ser-Ser-Leu-Ala-Gln-Pro-Leu-	
APA	Ser-Ile-Asn- - Thr-Val-Gln-Pro-Lys-Ala-Gln-Thr-Thr-Phe-Asp-Thr-Val-Lys-Ser-Gln-Leu-Asn-Ser-Pro-Leu-	
	_____ C7-31 _____ C17-4-1 _____ C14-1 _____	
	_____ T ₂ 5-4-1 _____ T ₂ 5-8 _____ T ₂ 5-6 _____	

170

P Val-Tyr-Leu-Ser-Ser-Asn-Asp-Ser-Gly-Ser-Val-Leu-Ileu-Gly-Gly-Ile-Asp-Ser-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Gly-Ser-
 PP Phe-Ala-Val-Ala-Leu-Lys-His-Gln-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr-Asp-Phe-Gly-Phe-Ile-Asp-Ser-Ser-Lys-Tyr-Thr-Gly-Ser-
 APA Phe-Ala-Val-Gln-Leu-Lys-His-Asp-Ala-Pro-Gly-Val-Tyr-Asp-Phe-Gly-Tyr-Ile-Asx-Asx-Ser-Lys-Tyr-Thr-Gly-Ser-
 _____ C10-4 _____ C29-1 _____ C20-1-3 _____ C8-3
 _____ T₂5-6 _____ T₃12-2 _____ T₁0-C10
 _____ P35-19 _____
 _____ P35-20 _____ Th26-4 _____

180

P Leu-Asn-Trp-Val-Pro-Val- - -Ser-Val-Glu-Gly-Tyr-Trp-Gln-Ile-Thr-Leu-Asp-Ser-Ile-Thr-Met-Asp-Gly-Glu-Thr-
 PP Leu-Thr-Tyr-Thr-Gly-Val-Asp-Asn-Ser-Gln-Gly-Phe-Trp-Ser-Phe-Asn-Val-Asp-Ser-Tyr-Thr-Ala-Gly-Ser-Gln-Ser-
 APA Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Glu-Gly-Tyr-Trp-Gly-Phe-Asn-Pro-Asn-Gly-Tyr-Ser-Ile-Cly-Asp-Ser-Ser-
 _____ C8-3 _____ C12-4 _____ C3-5
 _____ T₁0-C10 _____
 _____ Th29-2 _____
 _____ E18-32 _____

200

210
 P Ile-Ala-Cys-Ser-Gly-Gly-Cys-Gln-Ala-Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu-Leu-Thr-Gly-Pro-Thr-Ser-Ala-Ile-Ala-
 PP Gly-Asp-Gly-Phe- - - -Ser-Gly-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Leu-Leu-Leu-Leu-Asx-Asp-Ser-Val-Val-Ser-
 APA Ser-Ser-Gly-Phe- - - -Ser-Ala-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Leu-Ile-Leu-Leu-Asp-Asp-Glu-Ile-Val-Leu-
 C3-5 C3-4 E9-3 E9-1
 E20-12 E23-3 E14-5

220
 P Ile-Ala-Cys-Ser-Gly-Gly-Cys-Gln-Ala-Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu-Leu-Thr-Gly-Pro-Thr-Ser-Ala-Ile-Ala-
 PP Gly-Asp-Gly-Phe- - - -Ser-Gly-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Leu-Leu-Leu-Leu-Asx-Asp-Ser-Val-Val-Ser-
 APA Ser-Ser-Gly-Phe- - - -Ser-Ala-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Leu-Ile-Leu-Leu-Asp-Asp-Glu-Ile-Val-Leu-
 C3-5 C3-4 E9-3 E9-1
 E20-12 E23-3 E14-5

230
 P Ile-Asn-Ile-Gln-Ser-Asp-Ile-Gly-Ala- - - -Ser-Glu-Asn-Ser-Asp-Gly-Glu-Met-Val-Ile-Ser-Cys-Ser-Ser-Ile-Asp-
 PP Gln-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Val-Ser-Gly-Ala-Gln-Gln-Asp-Ser-Asn-Ala-Gly-Tyr-Val-Phe-Asx-Cys-Ser-Ser-Ser-Val-
 APA - -Asn-Gly-Ser-Glx-Val-Ser-Gly-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Ala-Asp-Gly-Tyr-Val-Phe-Asx-Cys-Ser-Thr-Thr-Pro-
 T10-C2-1 C19-2

240
 P Ile-Asn-Ile-Gln-Ser-Asp-Ile-Gly-Ala- - - -Ser-Glu-Asn-Ser-Asp-Gly-Glu-Met-Val-Ile-Ser-Cys-Ser-Ser-Ile-Asp-
 PP Gln-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Val-Ser-Gly-Ala-Gln-Gln-Asp-Ser-Asn-Ala-Gly-Tyr-Val-Phe-Asx-Cys-Ser-Ser-Ser-Val-
 APA - -Asn-Gly-Ser-Glx-Val-Ser-Gly-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Ala-Asp-Gly-Tyr-Val-Phe-Asx-Cys-Ser-Thr-Thr-Pro-
 T10-C2-1 C19-2

250
 P Ile-Asn-Ile-Gln-Ser-Asp-Ile-Gly-Ala- - - -Ser-Glu-Asn-Ser-Asp-Gly-Glu-Met-Val-Ile-Ser-Cys-Ser-Ser-Ile-Asp-
 PP Gln-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Val-Ser-Gly-Ala-Gln-Gln-Asp-Ser-Asn-Ala-Gly-Tyr-Val-Phe-Asx-Cys-Ser-Ser-Ser-Val-
 APA - -Asn-Gly-Ser-Glx-Val-Ser-Gly-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Ala-Asp-Gly-Tyr-Val-Phe-Asx-Cys-Ser-Thr-Thr-Pro-
 T10-C2-1 C19-2

E9-1 E14-5
 E14-2 E14-2 E14-2 E14-2 E14-2 E14-2
 E14-5 E14-5 E14-5 E14-5 E14-5 E14-5
 E1-8-18 E1-8-18 E1-8-18 E1-8-18 E1-8-18 E1-8-18
 E1-22 E1-22 E1-22 E1-22 E1-22 E1-22
 E1-8-15 E1-8-15 E1-8-15 E1-8-15 E1-8-15 E1-8-15

260
 P Gln-Leu-Pro-Asp-Ile-Val-Phe-Thr-Ile-Ile-Asp-Gly-Val-Gln-Tyr-Pro-Leu-Ser-Pro-Ser-Ala-Tyr-Ile-Leu-Gln-Asp-Asp-
 270
 PP Pro-Asx-Phe-Ser-Val-Ser-Ile-Ser-Gly-Tyr-Thr-Ala-Thr-Val-Pro-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Tyr-Gly-Pro-Ser-Gly-Asn-
 APA Pro-Asp-Phe-Thr-Gly-Xaa-Ile-Gly-Asp-Tyr-Lys-Ala-Val-Gly-Pro-Lys- - -Tyr-Ile-Asn-Tyr-Ala-Pro-Ser-Asx-Thr-
 _____ C30 _____
 _____ E1-22 _____ T₁₆₋₁ _____ E1-21 _____
 _____ E1-8-18 _____ E8-21 _____ Th19-4 _____ E1-8-17 _____
 _____ E1-8-15 _____ E30-0-2 _____ E1-13-9 _____

290
 P Asp-Ser- - -Cys-Thr-Ser-Gly-Phe-Glu-Gly-Met-Asp-Val-Pro-Thr-Ser-Ser-Gly-Glu-Leu-Trp-Ile-Leu-Gly-Asp-Val-
 300
 PP Gly-Ser-Thr-Cys-Leu-Gly-Gly-Ile-Gln-Ser-Asn- - - -Ser-Gly-Ile-Phe-Tyr-Leu-Ile-Phe-Gly-Asp-Ile-
 APA Pro-Ser-Thr-Cys-Phe-Gly-Gly-Ile-Gln-Ser-Asn- - - -Ser-Gly-Leu-Gly-Leu-Ser-Ile-Leu-Gly-Asp-Val-
 _____ E1-13-9 _____ T_{10-C5-1} _____ C11-2 _____
 _____ E1-21 _____
 _____ E1-8-17 _____
 _____ E1-13-10 _____

310
 P Phe-Ile-Arg-Gln-Tyr-Thr-Val-Phe-Asp-Arg-Ala-Asn-Asn-Lys-Val-Gly-Leu-Ala-Pro-Val-Ala-OH
 320
 PP Phe-Leu-Lys-Ser-Gln-Tyr-Val-Phe-Asp-Ser-Asp-Gly-Pro-Gln-Leu-Gly-Phe-Ala-Pro-Gln-Ala-OH
 APA Phe-Leu-Lys-Ser-Gln-Tyr-Val-Phe-Asp-Ser-Gln-Gly-Pro-Lys-Leu-Gly-Phe-Ala-Ala-Gln-Ala-OH
 _____ C27-4 _____ C19-1 _____ C6-2-2 _____
 C11-2 _____ T₃ (OC) 4-1 _____ T₁₆ _____ T₁₆₋₂ _____

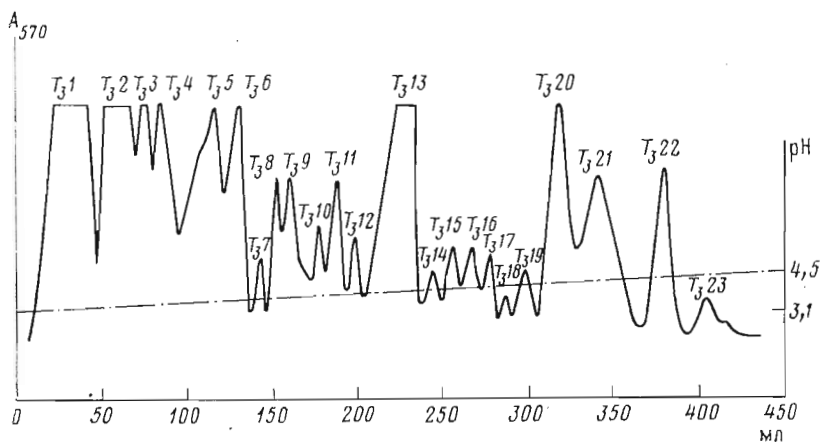


Рис. 2. Хроматография продуктов 6-часового триптического гидролиза аспергиллопепсина А на смоле Chromobeads (колонка $0,9 \times 60$ см) в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера

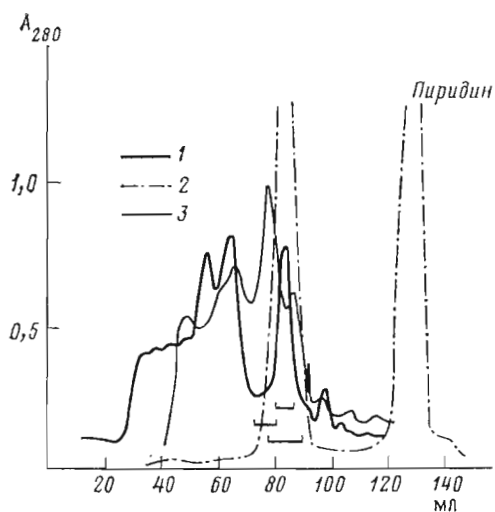


Рис. 3. Хроматография на сефадексе G-50sf (колонка 1×130 см) фракций триптического гидролизата аспергиллопепсина А: 1 — $T_3(OC)$ (отмечена фракция, содержащая пептид $T_3(OC)-4$); 2 — $T_3 12$ (отмечена фракция, содержащая пептид $T_3 12-1$); 3 — первой фракции эластазного гидролизата фрагмента $T_3 O$ после разделения его на Chromobeads (отмечена фракция, содержащая $T_3 O-E1-3$). Колонка уравновешена 6 М мочевиной в 0,05 М триэтиламин-карбонатном буфере, рН 8,2

пептидов $T_3 12-1$ и $T_3 8-2$ показывает, что пептид $T_3 8-2$ — фрагмент пептида $T_3 12-1$. Остаток Asn^3 пептида $T_3 12-1$ является N-концевым в пептиде $T_3 8-2$. N-Концевое положение в пептиде $T_3 12-1$ занимает остаток треонина; следовательно, в положении 2 находится остаток триптофана.

По данным электрофореза по Оффорду, пептиды $T_3 8-2$, $T_3 12-1$ и $T_3 12-1-Th4-1$ нейтральны. Значит, в состав пептида $T_3 12-1-Th4-1$ входит остаток аспарагина, который занимает и положение 8 в пептиде $T_3 12-1$. После отщепления одной аминокислоты от пептида $T_3 8-2$ последний оказывается нейтральным при электрофорезе по Оффорду, и, следовательно, N-концевое положение пептида $T_3 8-2$ занято остатком аспарагина, а положение 13 — аспарагиновой кислотой.

Фрагмент $T_3 O$, образовавшийся в результате 6-часового триптического гидролиза и состоящий из 128 аминокислотных остатков, окислили и гидролизовали эластазой. После разделения гидролизата на смоле Chromobeads в градиенте пиридин-ацетатного буфера [2] первую фракцию, содержащую остатки цистеиновой кислоты, хроматографировали на сефадексе G-50sf (рис. 3). Далее для очистки пептидов, содержащих цистеиновую кислоту, применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в градиенте метилового спирта (рис. 4). Аминокислотный состав пептидов и данные о последовательности, содержащей остаток цистеиновой кислоты, приведены в табл. 2.

Из эластазного гидролизата окисленного триптического фрагмента $T_2 1-2$ [1] с помощью ВЭЖХ были дополнительно выделены пептиды E1-

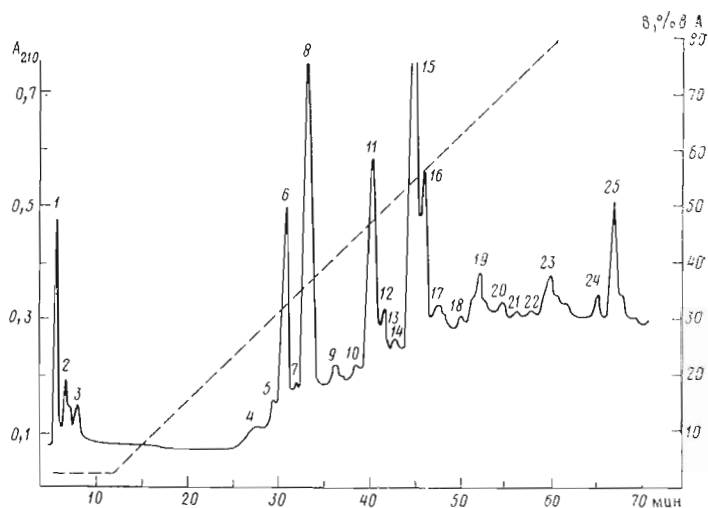


Рис. 4. ВЭЖХ фракции T₃O-E1-3. Пептиды T₃O-E1-3-6, T₃O-E1-3-11 и T₃O-E1-3-15 (табл. 2) содержатся соответственно во фракциях 6, 11 и 15

8-15, E1-8-17, E1-8-18 (рис. 5, табл. 2), включающие остаток цистеиновой кислоты. Сравнение аминокислотного состава и N- и C-концевых последовательностей пептидов E1-8-15 и E1-8-18 с последовательностью ранее выделенного пептида E1-22 [1], содержащего остаток цистеиновой кислоты и входящего в последовательность 250—258 аспергиллопепсина А, позволило идентифицировать остатки 249 и 259.

Пептид E1-8-17 состоит из 10 аминокислотных остатков, в число которых входит остаток цистеиновой кислоты. С-Концевое положение в нем занимает остаток изолейцина. По аминокислотному составу пептид E1-8-17 отличается от ранее описанного пептида E1-21 [1] (состоящего из 12 аминокислотных остатков) на остаток серина и глутамина (или глутаминовой кислоты).

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидов, содержащих цистеиновую кислоту

Аминокислота	Пептид					
	E1-8-15	E1-8-18	E1-8-17	T ₃ O-E1-3-6 *	T ₃ O-E1-3-11 *	T ₃ O-E1-3-15 *
Cys(O ₃ H)	(1)	(1)	(1)	(1)	0,9(1)	1 (1)
Asp	1,0(1)	1,67(2)	0,7(1)	2,3(2)	2,1(2)	2,1(2)
Thr	3,0(3)	3,3(3)	1,8(2)	1,2(1)	1,2(1)	1,1(1)
Ser	1,3(1)	1,2(1)	1,36(1)	2 (2)	1,9(2)	1,9(2)
Glu	0,3	0,4	0,35		0,3	
Pro	1,5(2)	2,3(2)	0,8(1)	2,2(2)	1,7(2)	1,9(2)
Gly	0,7(1)	0,9(1)	1,86(2)			0,2
Ala		0,25	0,14			0,1
Val						0,9(1)
Ile		0,25	0,67(1)			
Leu						
Tyr						
Phe	0,98(1)	1,2(1)	1,1(1)		0,8(1)	0,9(1)
His						
Lys						
Arg						
N-Концевая		Asx		Asx	Phe	Val
C-Концевая **	Gly		Ile	Asp		Asp

* T₃O-E1 — пептиды фракции I эластазного гидролизата фрагмента T₃O. Частичная последовательность пептида T₃O-E1-3-15: Val-Phe-Asx-Xaa-Ser-Thr-(Cys(O₃H), Ser, Pro)-Asp.

** C-Концевую аминокислоту определяли гидразинолизом.

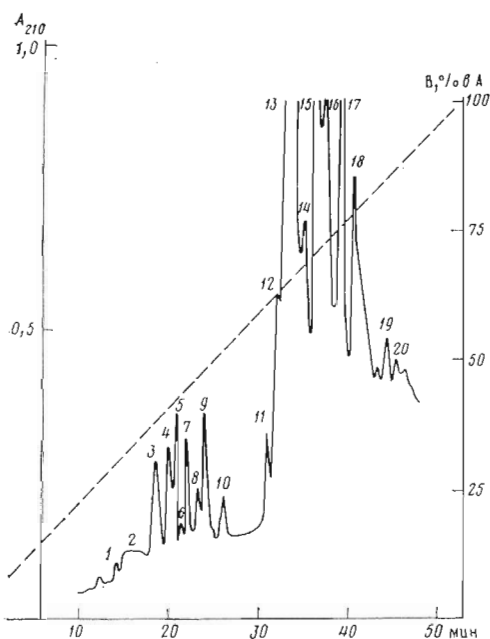


Рис. 5. ВЭЖХ фракции E1 эластазного гидролизата фрагмента T_{3,1-2} [1]. Рехроматография фракции E1-8. Пептиды E1-8-15, E1-8-17 и E1-8-18 (табл. 2) содержатся соответственно во фракциях 15, 17 и 18

рованные и немодифицированные пептиды разделяли на сефадексе G-25sf и выделяли хроматографией на бумаге. В табл. 4, 5 приведены данные о составе и последовательностях термолизиновых пептидов, а также соответствующие им участки последовательности аспергиллопепсина А.

Пептид Th 34-1 находится на участке последовательности 85—88 и обеспечивает перекрытие триптических и химо триптических пептидов.

Пептид Th26-4 уточняет последовательность на участке полипептидной цепи 170—174.

Расстановка пептидов в полипептидной цепи аспергиллопепсина А

Уже на первых этапах анализа первичной структуры фермента подтвердилось предположение о гомологии аминокислотных последовательностей аспергиллопепсина А, пепсина свиньи [5] и пенициллопепсина — аспартильной протеиназы микроскопического гриба *Penicillium janthinellum* [6].

Расстановка пептидов в первичной структуре аспергиллопепсина А основана на перекрывающихся последовательностях, а в ряде случаев на гомологии последовательностей этого фермента и изученных ранее аспартильных протеиназ. Кроме того, задача облегчилась выделением и изучением триптического фрагмента T₁O[2], состоящего из 128 аминокислотных остатков и занимающего в полипептидной цепи аспергиллопепсина А положение 175—308.

Реконструкция первичной структуры аспергиллопепсина А (рис. 1) проведена следующим образом. N-Концевая последовательность фермента до остатка 49 была определена автоматическим методом Эдмана. Эта последовательность на участке 23—49 совпадает с последовательностью пептида T₁3, также установленной автоматическим методом Эдмана и продолжающейся до остатка 50. Аминокислотная последовательность аспергиллопепсина А на участке 1—50 уточнена сравнением с пептидами C10-2, C26-1, C23-3 [3]. Было показано, что в положении 28 находится не остаток глутамина, как это было определено при использовании секвенатора, а остаток гистидина, являющийся N-концевым в пептиде C26-1.

Изучение пептического гидролизата аспергиллопепсина А позволило получить перекрывание химо триптических и триптических фрагментов на участке аминокислотной последовательности 157—168. Пептиды пептического гидролизата разделяли на Chromobeads (рис. 6). Для выделения индивидуальных пептидов применяли ВЭЖХ в градиенте метилового спирта (например, рис. 7). В табл. 3 приведены данные об аминокислотном составе пептидов, выделенных из фракций пептического гидролизата P19, P35 и P(OC), и показаны участки последовательности аспергиллопепсина А, занимаемые этими пептидами. Пептиды P35-19 и P35-20 дают перекрытия на участках последовательности 157—167 и 157—168. Ряд пептидов был получен из термолизинового гидролизата аспергиллопепсина А, модифицированного хлоридом *n*-нитрофенилдиазония [4]. Модифици-

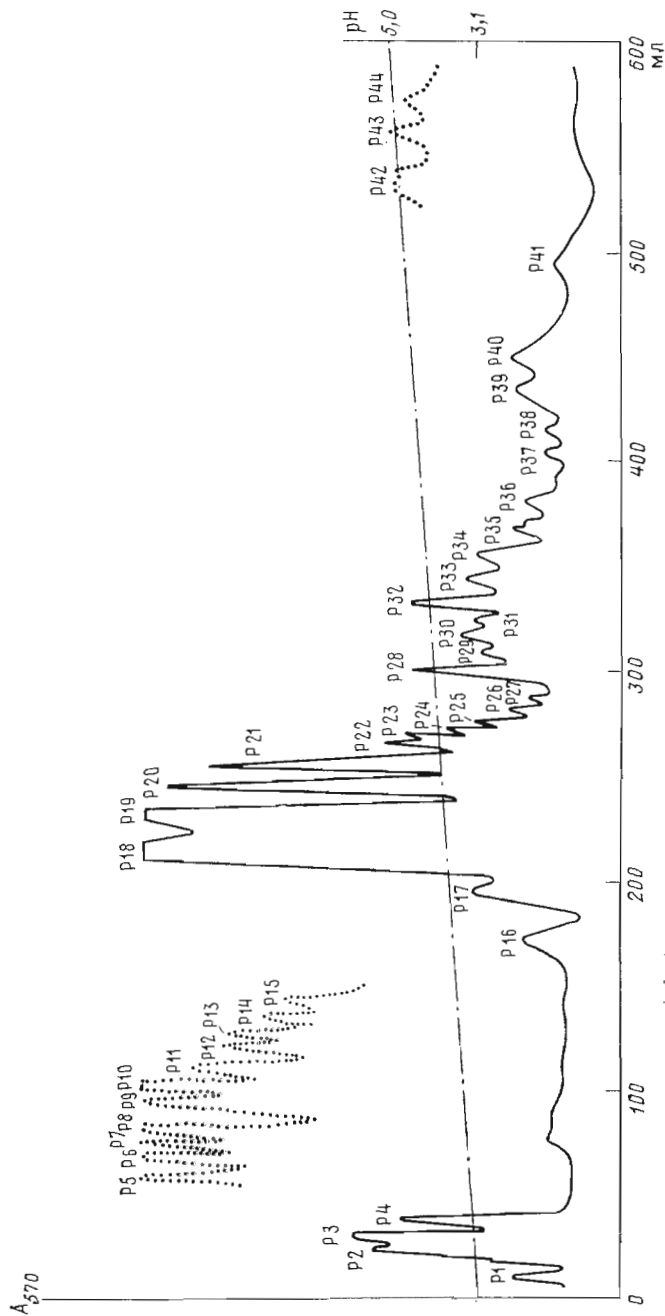


Рис. 6. Хроматография продуктов пептического гидролиза восстановленного карбоксиметилированного аспергиллопепсина А на смоле Sphomobeads (колонка $0,9 \times 60$ см) в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера. Пунктиром показаны фракции, обнаруженные с помощью гидролиза проназой Е

Аминокислотный состав пептических пептидов аспергиллопепсина А

Аминокислота	Пептид					
	P19-6	P19-12	P19-17	P35-13	P35-16	P35-19
Asp		1,5(2)		0,17	0,28	1,93(2)
Thr				0,22		0,2
Ser		0,2		0,9(1)	0,2	0,3
Glu				1(1)	0,3	
Pro					0,8(1)	
Gly	1,1(1)			0,11	1,2(1)	1,6(2)
Ala			0,95(1)	0,1	0,97(1)	1(1)
Val				0,2	0,8(1)	0,96(1)
Ile		1(1)		0,1		
Leu			1,05(1)	1,06(1)	0,13	0,76(1)
Tyr	0,8(1)	1(1)		1(1)	1,28(1)	0,76(1)
Phe			1(1)		0,14	1,3(1)
His				0,2	0,3	1,06(1)
Lys				1,1(1)	1,4	1,06(1)
Arg						
Участок полипептидной цепи	68-69 и др.	169-172	152-154	307-311	266-272	157-168

Таблица 3 (окончание)

Аминокислота	Пептид				
	P35-20	P(OC)-4	P(OC)-6	P(OC)-7	P(OC)-11
Asp	2,0(2)	0,92(1)	0,3	0,86(1)	1,17(1)
Thr	0,2	0,15	0,3	2(2)	
Ser		1,76(2)	1,15(1)	2,9(3)	1,03(1)
Glu		1,08(1)	1,15(1)	0,7(1)	0,96(1)
Pro	1,1(1)				1,0(1)
Gly	1,16(1)	2,76(3)	0,4	1,8(2)	1,96(2)
Ala	0,97(1)	0,3	0,3	1,2(1)	
Val	0,85(1)	0,17	0,2	0,4	
Ile		0,82(1)	0,1	0,9(1)	
Leu	1,1(1)			0,5	0,98(1)
Tyr	0,76(1)		1(1)	0,3(1)	
Phe	1(1)			0,3	0,96(1)
His	1,1(1)			0,26	
Lys	0,95(1)		1(1)	0,18	0,98(1)
Arg					
Участок полипептидной цепи	157-167	285-297	308-311	177-188	315-323

Анализ последовательностей ряда триптических и химотриптических пептидов, а также термолизинного пептида Th34-1, содержащего остатки 85—88, позволяет реконструировать полипептидную цепь до остатка 111.

Последовательность 112—125 соответствует химотриптическому пептиду С1-4 [3], содержащему 14 аминокислотных остатков. Для нее не удалось получить перекрывающихся последовательностей ни с аминного, ни с карбоксильного конца. Сравнение структуры пептида С1-4 и участка последовательности 112—125 пенициллопепсина и пепсина свиньи показало, что остаткам глутамина в положениях 112 и 113 пенициллопепсина соответствуют остатки глутамина или глутаминовой кислоты в положениях 1 и 2 пептида С1-4. С-Концевое положение в пептиде С1-4 и положение 125 в пепсине свиньи занято остатком тирозина, а в пенициллопепсине — остатком фенилаланина. Остатком 124 в пенициллопепсине и пепсине свиньи и остатком 13 в пептиде С1-4 является аланин. Таким образом, есть определенное сходство последовательностей пептида С1-4 и участка 112—125 полипептидных цепей пенициллопепсина и пепсина свиньи. Последовательность участка 126—174 составлена из последовательностей ряда три-

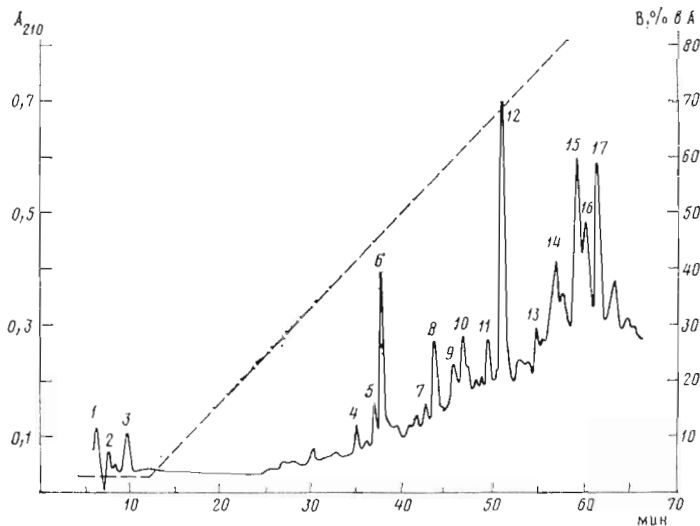


Рис. 7. ВЭЖХ фракции пентического гидролизата P19. Пептиды P19-6, P19-12 и P19-17 (табл. 3) содержатся соответственно во фракциях 6, 12 и 17

птических и химотриптических пептидов; кроме того, использованы данные анализа пептических пептидов P-35-19 и P-35-20.

Последовательность от остатка Tyr¹⁷⁵ до остатка Lys³⁰⁸ соответствует триптическому фрагменту T₁O, состоящему из 128 аминокислотных остатков. Этот фрагмент занимает в первичной структуре аспергиллопепсина А положение, соответствующее в пространственной структуре аспартильных протеиназ С-концевому домену [7]. Последовательность 170—178, которая включает остаток Tyr¹⁷⁵, являющийся N-концевым у пептида T₁O, отчетливо гомологична у аспергиллопепсина А, пенициллопепсина и пепсина свиньи, что и позволяет считать пептид T₁O продолжающим структуру триптического пептида T₃12-2, несмотря на то что перекрывание пептида С20-12-3 и пептида T₁O составляет только один остаток.

Структура участка 175—308 складывается из последовательностей пептидов химотриптических гидролизатов аспергиллопепсина А и T₁O и эластазного гидролизата фрагмента T₂1-2. Фрагмент T₁O состоит из двух полипептидных цепей: от остатка 175 до остатка 270 и от остатка 272 до остатка 308, соединенных дисульфидной связью между Cys²⁵⁰ и Cys²⁸³.

Таблица 4

Аминокислотный состав термолитиновых пептидов

Аминокислота	Пептид					
	Th19-4	Th26-3	Th26-4	Th28-2	Th29-2	Th34-1
Asp		1,4(1)	1,8(2)		1,15(1)	0,96(1)
Thr					0,96(1)	1(1)
Ser		1,3(1)	1(1)			
Glu		1,02(1)	0,15			
Pro	0,9(1)	0,9(1)				
Gly		1(1)		1(1)		
Ala	1,1(1)					
Val						
Ile			0,8(1)			
Leu						
Tyr	0,91(1)			1,1(1)	1(1)	0,8(1)
Phe				0,8(1)		
His						
Lys		0,9(1)	1(1)			
Arg						1(1)

Аминокислотная последовательность термолизиновых пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность	Участок полипептидной цепи
Th19-4	Tyr-Ala-Pro	275-277
Th26-3	Asx-Ser-Glx-Gly-Pro-Lys	315-320
Th26-4	Ile-Asx-Asx-Ser-Lys	170-174
Th28-2	Phe-Gly-Tyr	166-168
Th29-2	Tyr-Thr-Asp	181-183
Th34-1	Tyr-Arg-Asp-Thr	85-88

Автоматическим методом Эдмана определена последовательность остатков, начиная с остатков 175 и 272 (11 и 5 остатков соответственно).

Последовательность до остатка 220 установлена сравнением последовательностей перекрывающихся пептидов и данных автоматического метода Эдмана. Для расстановки пептидов, примыкающих к остатку 221, использована гомология последовательностей аспергиллопепсина А и пенициллопепсина.

Последовательность, включающая остаток полуцистина-250, соответствует пептиду E1-22 [1], содержащему остаток цистеиновой кислоты. Остатки Asx²⁴⁹ и Gly²⁵⁹ определены как N-концевой и C-концевой в пептидах E1-8-15 и E1-8-18, отличающихся от пептида E1-22 на один аминокислотный остаток (см. табл. 2). На этом участке порядок расположения пептидных фрагментов также основан на гомологии со структурами пепсина свиньи и пенициллопепсина.

Участок последовательности 261—277 составлен путем сравнения последовательностей триптического, химотриптических, эластазных и термолизиновых пептидов с учетом определения автоматическим методом Эдмана N-концевых последовательностей фрагмента T₁O. Этот участок находится между остатками полуцистина и легко гидролизуетея трипсином по связям, образованным остатками Lys²⁶⁵ и Lys²⁷⁰, и химотрипсином по связям, в которых участвуют остатки Tyr²⁶⁴ и Tyr²⁷². Эта последовательность содержит ряд остатков, идентичных имеющимся в последовательности 261—277 пенициллопепсина: Ile²⁶¹, Tyr²⁶⁴, Ala²⁶⁶, Pro²⁶⁹, Ile²⁷³, Tyr²⁷⁵, Pro²⁷⁷.

Размещение последовательности, начинающейся с остатка 261, за последовательностью 250—259 также основано на гомологии. Аминокислотный остаток 260 идентифицировать не удалось.

Последовательность 278—288, содержащая остаток полуцистина-283, установлена на основании определения частичной последовательности пептида E1-21, содержащего цистеиновую кислоту (выделенного из эластазного гидролизата фрагмента T₂1-2), и данных о составе, а также N- и C-концевых аминокислотах других пептидов эластазного гидролизата, содержащих цистеиновую кислоту (см. табл. 2, [1]).

Последовательности 282—288 аспергиллопепсина А и пенициллопепсина, содержащие остатки полуцистина-283, гомологичны и различаются лишь одной заменой лейцина на фенилаланин в положении 284 аспергиллопепсина А.

Для расстановки аминокислотных остатков 300—306 использована гомология последовательностей пептида C11-2 аспергиллопепсина А и последовательности 300—306 пепсина свиньи, которые различаются лишь остатком в положении 300.

Таким образом, на участке полипептидной цепи от остатка 220 до остатка 306 для стыковки отрезков последовательностей аспергиллопепсина А использована гомология с пенициллопепсином и пепсином свиньи.

Аминокислотная последовательность С-концевого участка 307—327 аспергиллопепсина А получена из ряда перекрывающихся триптических, хмотриптических и пептических пептидов.

Сравнивая первичные структуры аспергиллопепсина А, пепсина свиньи и пенициллопепсина, следует отметить, что наиболее ярко выражена гомология между двумя грибными протеиназами. Так, если степень гомологии между аспергиллопепсином А и пепсином свиньи составляет 26%, то для аспергиллопепсина А и пенициллопепсина она достигает 61%. Большое сходство последовательностей, окружающих остатки аспарагиновой кислоты, находящиеся в положении 32 и 215, еще раз подчеркивают их функциональную роль в каталитическом центре аспергиллопепсина А и других аспартильных протеиназ. На участке последовательности 29—42, включающем Asp³², в аспергиллопепсине А и пенициллопепсине совпадают 13 остатков, а в аспергиллопепсине А и пепсине свиньи — 9. В последовательности 213—225, включающей аспарагиновую кислоту 215, у аспергиллопепсина А и пенициллопепсина совпадают 12 остатков, у аспергиллопепсина А и пепсина свиньи — 6.

Следует отметить также и наличие других участков с высокой степенью гомологии последовательностей аспергиллопепсина А и пенициллопепсина. Среди них фрагмент 126—146, в котором имеются замены остатков лишь в двух положениях, и С-концевая часть, где на участке 306—327 совпадают 19 остатков.

Данные о гомологии последовательностей аспергиллопепсина А и пенициллопепсина указывают на близость их пространственных структур. По-видимому, сходны также пространственные структуры аспергиллопепсина А и пепсина свиньи.

Экспериментальная часть

В работе использовали аспергиллопепсин А, полученный как описано ранее [2], карбоксиметилированный аспергиллопепсин А, полученный по методике [8], трипсин (Worthington, США), эластазу (Serva, ФРГ), пепсин [9], проназу Е (Merck, ФРГ).

Гидролиз трипсином. К раствору 780 мг инактивированного фенолом аспергиллопепсина А в 250 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера (рН 8,5) добавили 8 мг трипсина в 4 мл этого же буфера, выдержали 2 ч при 37° С, затем подкислили 50% СН₃СООН до рН 5,0 и оставили на 30 мин при 4° С. Образовавшийся осадок отцентрифугировали, растворили в 70 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера (рН 8,5), подкислили 50% СН₃СООН до рН 5, оставили на 30 мин при 4° С, осадок (Т₃О) отделили центрифугированием. Супернатанты объединили, лиофилизовали, растворили в 200 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера, добавили 8 мг трипсина в 4 мл этого же буфера и выдержали 4 ч при 37° С. Гидролизат лиофилизовали, растворили в 8 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 3,4, нерастворившуюся часть Т₃(ОС) промыли 8 мл этого же буфера и центрифугировали. Супернатанты объединили, рН довели до 2,5 конц. НСООН, раствор нанесли на колонку (0,9 × 60 см) со смолой Chromobeads. Хроматографию вели по методике [2] и получили 23 фракции Т₃1 — Т₃23 (рис. 2). Анализировали фракции Т₃4, Т₃8, Т₃9, Т₃11, Т₃12, Т₃16, Т₃17, Т₃19, Т₃22.

Пептид Т₃(ОС)-4-1. Осадок Т₃(ОС), образовавшийся при растворении продуктов 6-часового триптического гидролиза в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,4), растворили в 2 мл 6 М мочевины в 0,05 М триэтиламин-карбонатном буфере, рН 8,3. Осадок отделили центрифугированием, раствор нанесли на колонку (1 × 130 см) с сефадексом G-50sf (рис. 3). Фракции обессоливали на колонке (1,5 × 80 см) с сефадексом G-10, уравновешенным триэтиламин-карбонатным буфером, рН 8,2. Фракцию Т₃(ОС)-4 хроматографировали на бумаге в системе пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота, 10 : 15 : 12 : 3, после чего 1% пиридином элюировали пептид Т₃(ОС)-4-1.

Пептид Т₃12-1. Фракцию Т₃12 растворили в 5 мл 1% пиридина, осадок отделили центрифугированием, растворили в 2 мл 50% пиридина, 1 мл этого раствора нанесли на колонку с сефадексом G-50sf, уравновешенным 6 М мочевиной в 0,05 М триэтиламин-карбонатном буфере, рН 8,5, элюировали этим же буфером (рис. 3). Обессоливание проводили на колонке (1,5 × 80 см) с сефадексом G-25sf, уравновешенным тем же буфером.

Окисление и гидролиз эластазой пептида Т₃О. К 9 мл 88% HCOOH добавили 1 мл 30% H₂O₂, смесь выдерживали 1 ч при 0° С, добавили 4 мкмоль пептида Т₃О и оставили при 0° С на 4 ч, затем заморозили и высушили в вакуум-эксикаторе над КОН. К остатку добавили 25 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера, рН 8,2, и 100 мкл суспензии эластазы (25 мг/мл), инкубировали 20 ч при 37° С. Гидролизат лиофилизировали, растворили в 8 мл буфера, рН 2,5, полученного добавлением муравьиной кислоты к пиридин-ацетатному буферу, рН 3,1, нанесли на колонку (0,9 × 60 см) со смолой Chromobeads, хроматографию вели по методике [2] (рис. 6).

Гидролиз пепсином. 400 мг карбоксиметилированного аспергиллопепсина А растворили в 120 мл 0,2 М NH₄HCO₃, рН 8, добавили ледяную уксусную кислоту до рН 5,4, затем 20 мг пепсина, оставили на 4 ч при 37° С, периодически встряхивая. Довели рН до 3,7 ледяной уксусной кислотой и оставили на 2 ч при 37° С. Образовавшийся осадок отделили центрифугированием, раствор упарили досуха, остаток растворили в 10 мл буфера, рН 2,5, полученного добавлением муравьиной кислоты к пиридин-ацетатному буферу, рН 3,1. Нерастворившийся остаток отделили центрифугированием, раствор нанесли на колонку (0,9 × 60 см) со смолой Chromobeads и элюировали в градиенте пиридин-ацетатного буфера, как описано ранее [2].

Применение проназы Е для выявления пептидсодержащих фракций. После фракционирования пептического гидролизата на смоле Chromobeads из каждой фракции отбирали по 80 мкл элюата, аликвоты упаривали досуха, добавляли по 80 мкл проназы Е в 0,2 М боратном буфере, рН 8 (0,025 мг/мл), инкубировали 20 ч при 37° С, затем с помощью нингидрина выявляли фракции, содержащие пептиды.

Гидразинолиз. 2,5 — 25 нмоль пептида помещали в ампулу (5 × 40 мм), высушивали в течение нескольких суток в вакуум-эксикаторе над КОН, добавляли 10—40 мкл перегнанного над КОН гидразина. Гидразинолиз проводили 2 ч при 105° С, затем упаривали в вакуум-эксикаторе над КОН и лимонной кислотой. Идентификацию аминокислот проводили дансилированием.

Определение аминокислотной последовательности методом Эдмана в сочетании с дансилированием проводили по методике [2].

Заряд пептидов определяли по данным электрофореза по Оффорду при рН 6,5 по методике [10].

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Использован жидкостный хроматограф фирмы LDC (США). Раствор пептида в 100—200 мкл 0,05% CF₃COOH (раствор А) наносили на колонку (4,6 × 250 мм) Spherisorb ODS (5 мкм), промывали этим же раствором со скоростью 0,5 мл/мин, затем вели градиентную элюцию 80% метиловым спиртом (раствор В) в этом растворе со скоростью 0,5 мл/мин, поглощение элюата определяли при 210 нм (см. рис. 4, 5, 7).

Хроматографию на бумаге проводили в системе пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота, 10 : 15 : 12 : 3. В аналитическом варианте использовали хроматографию в тонком слое целлюлозы (Serva), в препаративном — Whatman ЗММ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Остославская В. И., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Сурова И. А., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Степанов В. М. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1614—1620.
2. Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сурова И. А., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Немцова Е. Р., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1765—1777.

3. Котлова Е. К., Остославская В. И., Ревина Л. П., Ковалева Г. Г., Сурова И. А., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 58—67.
4. Тарасова Н. И., Лавренова Г. И., Степанов В. М. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 2, с. 369—375.
5. Sepulveda P., Marciszyn J., Jr., Liu D., Tang J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 13, p. 5082—5088.
6. I-Nan Hsu, Delbaere L. T. J., James M. N. G., Hofmann T. Nature, 1977, v. 266, № 10, p. 140—145.
7. James M. N. G., Sielecki A. R. J. Mol. Biol., 1983, v. 163, № 2, p. 299—361.
8. Левин Е. Д., Егоров Ц. А., Степанов В. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1965, № 5, с. 825—831.
9. Соловьева Т. А., Беляев С. В., Степанов В. М. Химия природн. соединен., 1977, № 3, с. 398—403.
10. Offord R. E. Nature, 1966, v. 211, № 5049, p. 591—595.

Поступила в редакцию
12.IX.1985
После доработки
13.I.1986

**THE PRIMARY STRUCTURE OF ASPERGILLOPEPSIN A, ASPARTIC PROTEINASE
FROM *ASPERGILLUS AWAMORI*. IV. AMINO ACID SEQUENCE
OF THE ENZYME**

OSTOSLAVSKAYA V. I., REVINA L. P., KOTLOVA E. K., SUROVA I. A.,
LEVIN E. D., TIMOKHINA E. A., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Moscow*

The primary structure of aspergillopepsin A, an aspartic proteinase of microscopic fungus *Aspergillus awamori*, containing 320 amino acid residues, was determined basing on the analysis of tryptic, chymotryptic, elastic and peptic peptides of the enzyme. The peptide fragments were arranged in the aspergillopepsin A sequence using the overlapping peptides and, in some cases, the data on homology of aspartic proteinases. The homology between the amino acid sequences of aspergillopepsin A and penicillopepsin is 61%, between aspergillopepsin A and porcine pepsin — 26%. A substantially higher homology was found for the sequences surrounding the aspartic acid residues 32 and 215. It was supposed that the spatial structure of aspergillopepsin A should be similar to those of penicillopepsin, another fungi proteinase, and animal pepsin.