



УДК 577.152.277*6.01:577.112.5

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНАЯ РИБОНУКЛЕАЗА Sa
АКТИНОМИЦЕТА *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*.
ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И ГОМОЛОГИЯ С РИБОНУКЛЕАЗАМИ
БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ

Шляпников С. В., Ботт В.*, Куликов В. А.,
Дементьев А. А., Зелинка Я.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Институт молекулярной биологии Словацкой Академии наук, Братислава

Методом экспресс-анализа аминокислотной последовательности белков, который исключает фракционирование пептидных гидролизатов, установлена полная первичная структура гуанилспецифичной РНКазы Sa из актиномицета *Streptomyces aureofaciens*. В работе использована автоматическая деградация по Эдману S-карбоксиметилированной РНКазы и двух нефракционированных пептидных смесей, полученных при расщеплении модифицированного белка стафилококковой протеиназой и трипсином. РНКазы Sa содержит 96 остатков аминокислот: 7 Asp, 2 Asn, 12 Thr, 7 Ser, 5 Glu, 5 Gln, 6 Pro, 8 Gly, 6 Ala, 3 Cys, 6 Val, 5 Ile, 6 Leu, 8 Tyr, 3 Phe, 2 His и 5 Arg (M_r 10 566). В ряду различных РНКаз микроорганизмов, изученных к настоящему времени, первичная структура РНКазы Sa наиболее подобна структуре РНКазы St из *S. erythraeus*. Гомология аминокислотных последовательностей РНКаз Sa и St достигает 59%. Предсказывая методом Чоу и Фасмана вторичная структура РНКазы Sa соответствует в целом данным рентгеноструктурного анализа РНКазы St.

Значительные успехи, достигнутые в последние несколько лет в очистке ряда внеклеточных РНКаз различных микроорганизмов и получении гомогенных форм ферментов, являются существенной предпосылкой интенсивного развития работ по исследованию их аминокислотной последовательности — важного этапа, необходимого для более глубокого изучения третичных структур белков и принципов белково-нуклеинового узнавания. РНКазы прокариотов и низших эукариотов, источниками которых могут служить бактерии, плесневые грибы, актиномицеты и дрожжи, представляют собой удобную модель для изучения молекулярной эволюции белков, анализа корреляции структуры и функции этих ферментов, исследования их механизма и эффективности катализа.

Из многочисленного семейства описанных в литературе внеклеточных РНКаз микроорганизмов [1] наиболее изученными представителями РНКаз бактерий являются РНКазы Ba из *Bacillus amyloliquefaciens* [2] и РНКазы Vi из *B. intermedius* [3], а для РНКаз грибов — РНКазы T₁ из *Aspergillus oryzae* [4, 5], РНКазы Ms из *A. saitoi* [6], РНКазы C₂ из *A. clavatus* [7], РНКазы Pb₁ из *Penicillium brevicompactum* [8], РНКазы U₁ и U₂ из *Ustilagosphaerogena* [9, 10], РНКазы PCh₁ из *P. chrysogenum* [11] и РНКазы F₁ из *Fusarium moniliforme* [12]. Для всех них (кроме РНКазы U₁) установлены полные первичные структуры, а для части РНКаз прослежена пространственная топография [13—17]. В то же время структурные исследования внеклеточных РНКаз актиномицетов ограничены единственным примером РНКазы St из *Streptomyces erythraeus* [18, 19], а для РНКаз дрожжей данные такого уровня отсутствуют вообще. Очевидно, что лучшее понимание молекулярных основ эволюции внеклеточных РНКаз микроорганизмов может быть достигнуто при расширении круга анализируемых объектов.

В представленном сообщении описано определение аминокислотной последовательности РНКазы Sa, внеклеточной гуанилспецифичной РНКазы, выделенной из актиномицета *S. aureofaciens* (КФ 2.7.7.26), проведен теоретический анализ ее вторичной структуры и представлен сравнительный

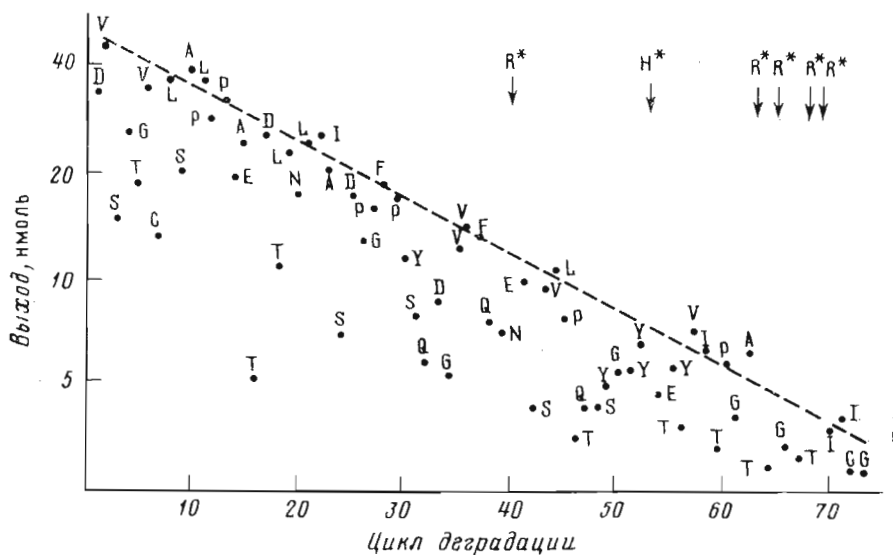


Рис. 1. Выход аминокислот при автоматической деградации CM-PHКаза Sa. Использован однобуквенный код аминокислот. Выход остатков аргинина (R*) и гистидина (H*) не определялся. Прямая характеризует величину среднего постадийного выхода для стабильных производных аминокислот

анализ гомологии PHКаза Sa с другими PHКазами микроорганизмов, в частности с PHКазой St.

Стратегия определения первичной структуры PHКаза Sa основана главным образом на технике автоматического секвенирования полипептидов и использовании ранее апробированного метода автоматической деградации по Эдману нефракционированных пептидных гидролизатов белка [8, 20].

В настоящей работе расшифровка полной аминокислотной последовательности PHКаза включает преимущественно данные двух типов автоматического секвенирования. Во-первых, это секвенирование восстановленного и карбоксиметилированного белка (CM-PHКаза Sa), что при среднем постадийном выходе эдмановской деградации, равном 97% (рис. 1), позволило идентифицировать 73 аминокислотных остатка в N-концевой области полипептида.

Второй тип секвенирования представлен результатами автоматической деградации по Эдману нефракционированной пептидной смеси, полученной при триптическом гидролизе CM-PHКаза Sa, предварительно подвергнутой 21 полному циклу автоматической деградации (дез-(1-21)-CM-PHКаза Sa)* и обработанной после этого флуорескамином [20] (см. «Экспериментальную часть» и табл. 1). Подобная модификация приводит к блокированию α -NH₂-групп всех N-концевых остатков полипептидов (за исключением Pro), что позволяет уменьшить общее количество анализируемых после трипсинолиза пептидов, снижая одновременно и уровень фона «остаточных» продуктов, накапливаемых в ходе предварительной деградации [24] (рис. 2a — в). Полипептидная цепь PHКаза Sa содержит последовательность -Arg⁶³-Arg-Ile⁷⁰-, поэтому в соответствии со специфичностью действия трипсина наблюдалось образование двух гомологичных пептидов: Arg⁶⁹-Ile-... и Ile⁷⁰-... (табл. 1).

* Согласно предварительным данным, в аминокислотном составе PHКаза предполагалось наличие одного остатка Met и одного Lys [21, 22]. Однако проведение 21 полного цикла эдмановской деградации продуктов, полученных при обработке белка 300-кратным молярным избытком BrCN (в 70% трифторуксусной кислоте в течение 24 ч) или лизинспецифичной протеиназой [23], показало в обоих случаях, что секвенированию подвергается только одна исходная полипептидная цепь PHКаза. Таким образом, обработанные препараты белка были использованы для исследования нефракционированных пептидных гидролизатов PHКаза. При расшифровке полной аминокислотной последовательности PHКаза Sa, Met и Lys не были обнаружены.

Автоматическая деградация пептидных гидролизатов флуорескаминмодифицированной дез-(1-21)-СМ-РНКаза Sa, образующихся при действии трипсина (А) и стафилококковой протеиназы (Б)

Приведена аминокислота и ее выход, нмоль

Цикл деградации	А					Б				
1	E, 25	T, 33	G, 42	R, —	I, 49	S, 19	Y, 22	A, 41	D, 28	
2	S, 14	R, —	T, 36	I, 62*	I, 62*	V, 34	T, 35*	T, 35*	Y, 29	
3	V, 33		R, —	I, 10	C, 25	L, 31	V, 29	Q, 17	Y, 32	
4	L, 35		R, —	C, 5	G, 28	P, 26	I, 25	E, 9	T, 21	
5	P, 29			G, 6	E, 26	T, 27*	T, 27*		G, 25	
6	T, 15			E, 5	A, 35	Q, 15	P, 21		D, 21	
7	Q, 19			A, 7	T, 20	S, 11	G, 15		H, —	
8	S, 9			T, 4	Q, 25	Y, 27*	A, 18		Y, 27*	
9	Y, 19			Q, 31*	E, 31*	G, 16	R, —		A, 27	
10	G, 12			E, 5	D, 23	Y, 14	T, 23*		T, 23*	
11	Y, 38*			D, 5	Y, 38*	Y, 16	R, —		F, 21	
12	Y, 45*			Y, 45*	Y, 45*	H, —	G, 8		S, 9	
13	H, —			Y, 8	T, 16	E, 6	T, 5		L, 18	
14	Q, 11			T, 3	Q, 17		R, —		I, 19	
15	Y, 12			G, 3	D, 19		R, —		D, 9	
16	T, 5			D, 4	H, —		I, 11		Q, 8	
17	V, 14			H, —	Y, 14		I, 13		T, 4	
18	I, 10			Y, 3	A, 21		C, 12*		C, 12*	
19	T, 13*			A, 4	T, 13*		G, 4			
20	P, 4			н. и.	F, 17		E, 3			
21	G, 3			F, 3	S, 8					
22	A, 5			н. и.	L, 13					
23	н. и.			L, 3	I, 15					
24				I, 3	D, 11					
25				н. и.	Q, 8					
26				»	T, 5					
27				»	C, 6					
Позиция в цепи РНКаза	41—63	64—65	66—68/69	69—96	70—96	42—54	55—74	75—78	79—96	

Примечание. н. и. — неидентифицированный остаток; аргинин и гистидин количественно не определяли. Звездочкой отмечен суммарный выход аминокислоты.

В ходе проведения автоматической деградации по Эдману карбокси-метилированного белка в полипептидной цепи РНКаза Sa локализованы все остатки Arg и определена полная аминокислотная последовательность участков полипептидной цепи РНКаза, соответствующих триптическим фрагментам белка, примыкающим к остаткам Arg⁴⁰, Arg⁶³ и Arg⁶⁵, а также частичная последовательность остатков аминокислот, следующих за Arg⁶⁸ и Arg⁶⁹ (рис. 1). Анализ этих данных вместе с результатами автоматического секвенирования смеси триптических пептидов дез-(1-21)-СМ-РНКаза Sa (табл. 1) позволил определить аминокислотную последовательность белка в С-концевой части молекулы (рис. 3).

Дополнительная информация, подтверждающая представленные выше результаты, вытекает из рассмотрения кинетики гидролиза СМ-РНКаза Sa карбоксипептидазой Y (рис. 3, 4) и анализа продуктов автоматической деградации смеси пептидов, полученных при протеолизе флуорескамин-модифицированной дез-(1-21)-СМ-РНКаза Sa стафилококковой протеиназой (рис. 2г, 3, табл. 1). В последнем случае секвенированию подвергаются четыре пептида. Структура сегмента полипептидной цепи 42—73 была установлена ранее в ходе автоматической деградации СМ-РНКаза Sa.

Данные секвенирования пептидов, полученных при расщеплении РНКаза стафилококковой протеиназой, позволяют однозначно интерпретировать структуру С-концевого участка белка (83—96) и подтвердить корректность локализации аминокислотных остатков 74—82 при анализе пептидов триптического гидролизата дез-(1-21)-СМ-РНКаза Sa.

Таким образом (рис. 3), фермент представляет собой белок с молекулярной массой 10 566 Да и содержит 96 остатков аминокислот: 7 Asp,

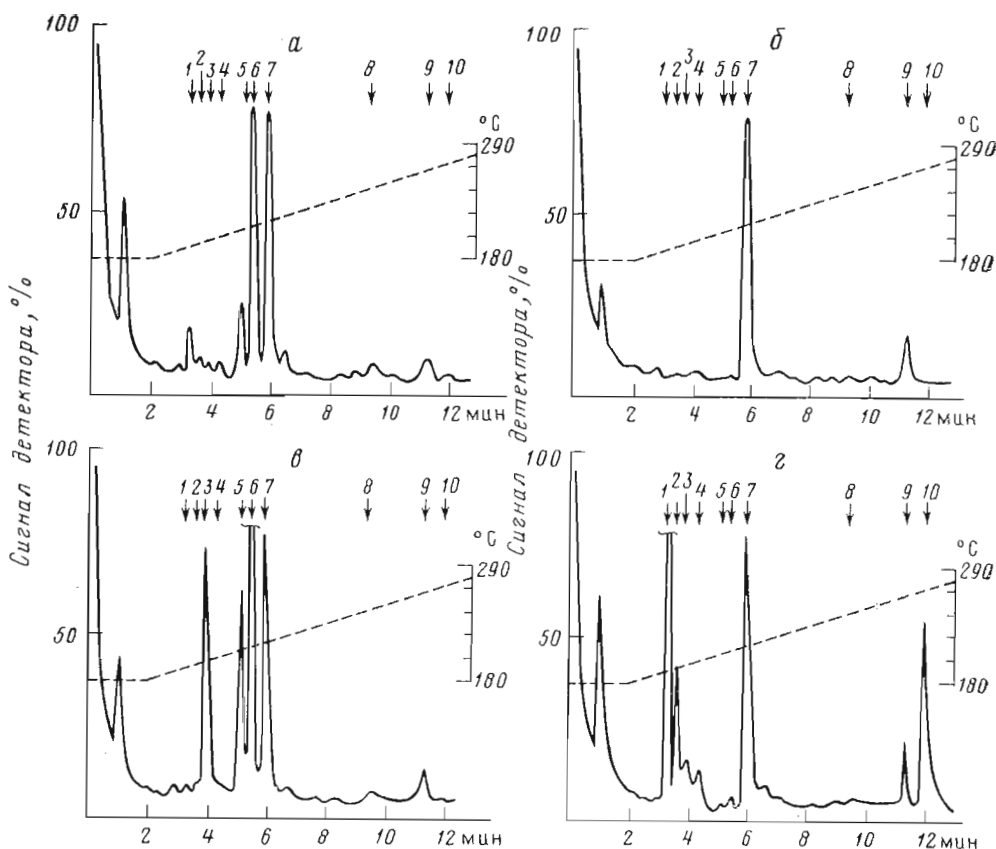


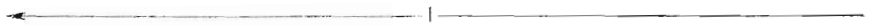
Рис. 2. ГЖХ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на 21-й (а), 22-й (б) и 23-й (в, г) стадиях автоматической деградации. После стадии 21 реакционная смесь обработана флуорескамином, проведена 22-я стадия деградации (контроль полноты модификации), затем гидролиз трипсином (в) или стафилококковой протеиназой (г) с последующим секвенированием — стадия 23. 1 — Ala, 2 — Cys(Cm)/Ser, 3 — Gly, 4 — Val, 5 — Pro/Thr, 6 — Leu/Ile, 7 — Nle (внутренний стандарт 27,2 нмоль), 8 — Phe, 9 — неидентифицированный продукт, 10 — Tyr. Условия ГЖХ (см. «Экспер. часть»)

2 Asn, 12 Thr, 7 Ser, 5 Glu, 5 Gln, 6 Pro, 8 Gly, 6 Ala, 3 Cys, 6 Val, 5 Ile, 6 Leu, 8 Tyr, 3 Phe, 2 His и 5 Arg.

На рис. 5 показано сравнение аминокислотной последовательности РНКазы Sa с первичными структурами бактериальных РНКаз Ba и Bi, с РНКазой St актиномицета и РНКазами грибов, относящихся к трем различным таксономическим группам: РНКазы T_1 является представителем РНКаз аскомицетов, РНКазы F_1 — несовершенных грибов и РНКазы U_2 — базидиомицетов. Следует отметить, что перечисленные РНКазы различаются по специфичности. Так, бактериальные РНКазы мало специфичны к нуклеотидным основаниям, РНКазы T_1 и F_1 подобно РНКазам актиномицетов гуанилспецифичны, а РНКазы U_2 обладает преимущественно специфичностью к пуриновым основаниям, в частности к аденину [1].

Химическая модификация РНКаз микроорганизмов, исследование кинетики катализируемых ими процессов и изучение их комплексов с субстратами методом ЯМР и рентгеноструктурного анализа показывают функциональную значимость остатков Glu^{54} , Arg^{69} и His^{85} , входящих в состав активных центров ферментов [13, 25, 26]. Эти остатки инвариантны для РНКаз как прокариотов, так и эукариотов (рис. 5). Другая область повышенного сходства структур белков охватывает участок аминокислотной последовательности 37—41, ответственный за специфическое «узнавание» ферментом того или иного субстрата [1, 13].

Asp-Val-Ser-Gly-Thr-Val-Cys-Leu-Ser-Ala-Leu-Pro-Pro-Glu-Ala-



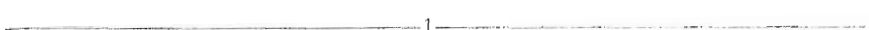
Thr-Asp-Thr-Leu-Asn-Leu-Ile-Ala-Ser-Asp-Gly-Pro-Phe-Pro-Tyr-



Ser-Gln-Asp-Gly-Val-Val-Phe-Gln-Asn-Arg-Glu-Ser-Val-Leu-Pro-



Thr-Gln-Ser-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-His-Glu-Tyr-Thr-Val-Ile-Thr-Pro-



Gly-Ala-Arg-Thr-Arg-Gly-Thr-Arg-Arg-Ile-Ile-Cys-Gly-Glu-Ala-



Thr-Gln-Glu-Asp-Tyr-Tyr-Thr-Gly-Asp-His-Tyr-Ala-Thr-The-Ser-



Leu-Ile-Asp-Gln-Thr-Cys



Рис. 3. Аминокислотная последовательность РНКазы Sa. Вертикальные стрелки — места расщепления модифицированного белка трипсином (T) и стафилококковой протеиназой (Sp). 1—3 — структуры, установленные при секвенировании СМ-РНКазы Sa и нефракционированных гидролизатов флуорескаминмодифицированной дез-(1-21)-СМ-РНКазы Sa. 4 — данные исследования кинетики гидролиза РНКазы карбоксипептидазой Y

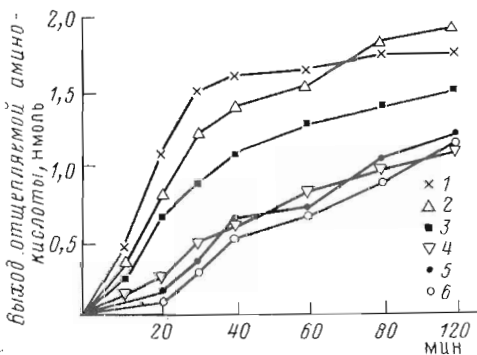


Рис. 4. Кинетика гидролиза СМ-РНКазы Sa карбоксипептидазой Y. Условия: 50 мМ N-этилморфолин-ацетат, pH 5,5; соотношение фермент — субстрат 1 : 75. 1 — Cys(Cm), 2 — Thr, 3 — Gln, 4 — Asp, 5 — Ile, 6 — Leu

Сравнение первичных структур внеклеточных РНКаз микроорганизмов показывает, что РНКазы бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов являются гомологичными ферментами, дивергировавшими от одного общего предшественника. Очевидно, что филогенетическая дистанция между семействами РНКаз про- и эукариотов проявляется в большом разнообразии и вариабельности их структур.

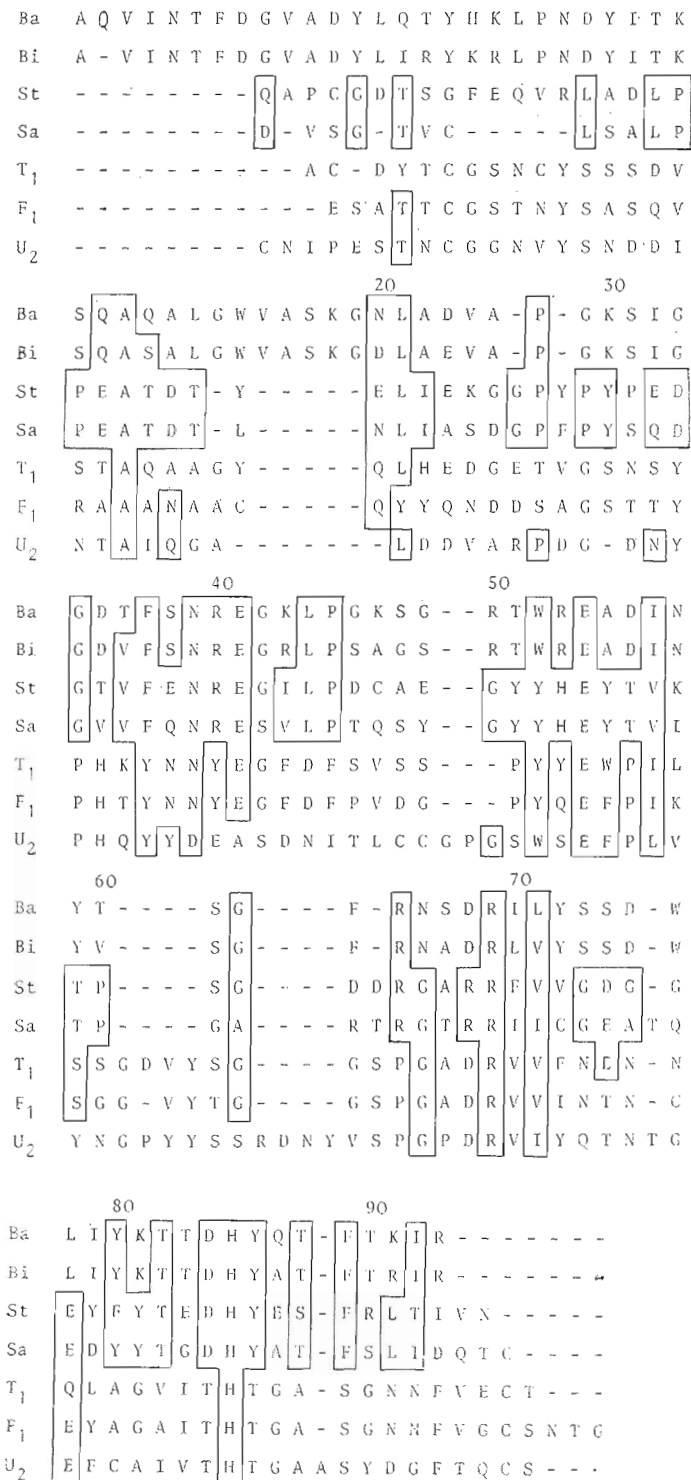


Рис. 5. Сравнение первичных структур РНКаз бактерий (РНКазы Ba и Bi), актиномицетов (РНКазы St и Sa) и грибов (РНКазы T₁, F₁ и U₂). Нумерация остатков приведена по аминокислотной последовательности РНКазы Sa. Инвариантные остатки РНКаз актиномицетов, включая гомологичные замены (T = S, Y = F = W, G = A, V = L = I, D = N = E = Q), заключены в рамки. Для максимальной гомологии в аминокислотные последовательности введены дефисы

Структурная гомология РНКаз грибов одной таксономической группы очень высока и варьирует в пределах от 60 до 90% и более [20, 27]. Вместе с тем сходство аминокислотных последовательностей для РНКаз грибов, относящихся к различным таксонам, весьма ограничено. Так, максимальная гомология (с учетом вводимых делеций) РНКаз T_1 , F_1 и U_2 не превышает 40% (рис. 5). Анализ структурной гомологии в ряду панкреатических РНКаз свидетельствует о существенно большем консерватизме первичных структур. Даже наиболее филогенетически удаленные пары панкреатических РНКаз сохраняют 60% структурного подобия [21, 29]. Однако, учитывая тот факт, что грибы — более древние организмы, которые к тому же эволюционируют со значительно большей скоростью, чем животные, подобный результат не является неожиданным. До некоторой степени удивительным в то же время представляется вариабельность в первичных структурах РНКаз грибов остатков полуцистина — как правило, наиболее консервативных в белках.

Все охарактеризованные в настоящее время в структурном отношении внеклеточные РНКазы аскомицетов содержат по четыре инвариантных остатка Cys, связанных попарно дисульфидными мостиками [20, 27]. Однако только два остатка Cys сохраняют свое положение в аминокислотной последовательности РНКазы F_1 (из четырех) и РНКазы U_2 (из шести), обеспечивая возможность образования, по-видимому, общей для всех РНКаз грибов и уникальной по своей стабильности дисульфидной связи между этими остатками [30]. Интересно при этом, что бактериальные РНКазы вообще не имеют в своем составе остатков Cys, тогда как в РНКазах актиномицетов наблюдается лишь частичное подобие в локализации остатков Cys сравнительно с РНКазами грибов. Единственная дисульфидная связь (Cys⁴-Cys⁵⁴) в молекуле РНКазы St [18] неэквивалентна S—S-мостикам РНКаз грибов, а остатки полуцистина в РНКазах St и Sa расположены в разных местах цепи белков. С другой стороны, не может быть полностью исключено соответствие остатков Cys⁴ РНКазы St и Cys² РНКазы T_1 аскомицетов (рис. 5).

РНКазы Sa содержит три остатка полуцистина, причем если локализация Cys⁷² в участке РНКазы Sa, непосредственно примыкающем к области активного центра фермента и включающем функционально важный остаток Arg⁶⁹, представляется в ряду анализируемых белков с первого взгляда неожиданной, то два других полуцистина, Cys⁷ и Cys⁹⁶, адекватны, по-видимому, инвариантной паре S—S-связанных остатков РНКаз грибов. Иное относительное расположение N-концевой аминокислотной последовательности РНКазы Sa, приводящее к совпадению Cys⁷ РНКазы Sa и Cys⁴⁰ РНКазы T_1 , является, на наш взгляд, менее вероятным, хотя в этом случае сохраняется тот же уровень максимальной гомологии структур двух РНКаз актиномицетов (рис. 5). Вместе с тем анализ S—S-связей в молекуле РНКазы F_1 , в которой нет свободных сульфгидрильных групп и пространственная структура белка поддерживается двумя дисульфидными мостиками, показывает, что один из них, вероятно, связывает остатки Cys²⁴ и Cys⁵⁴ [12].

В ряду РНКаз бактерий, актиномицетов и грибов аминокислотная последовательность РНКазы Sa имеет наибольшее сходство со структурой РНКазы St. Для первичных структур РНКаз актиномицетов уровень максимальной гомологии составляет 59%. В свою очередь сравнение аминокислотных последовательностей РНКаз актиномицетов и бактериальных РНКаз показывает гораздо более низкий уровень максимальной гомологии. Для РНКаз актиномицетов и грибов идентичными (кроме одного остатка Ala) являются лишь остатки активного центра ферментов.

Расчет вторичной структуры РНКаз актиномицетов по модифицированному методу Чоу и Фасмана [31, 32] позволяет проследить распределение основных топологических элементов структуры белков по ходу полипептидной цепи (рис. 6, табл. 2). Согласно полученным данным, в структуре РНКазы St предсказывается наличие одной α -спирали, которая включает участок аминокислотной последовательности белка 19—31, и четыре элемента β -структуры, ограниченных сегментами полипептидной

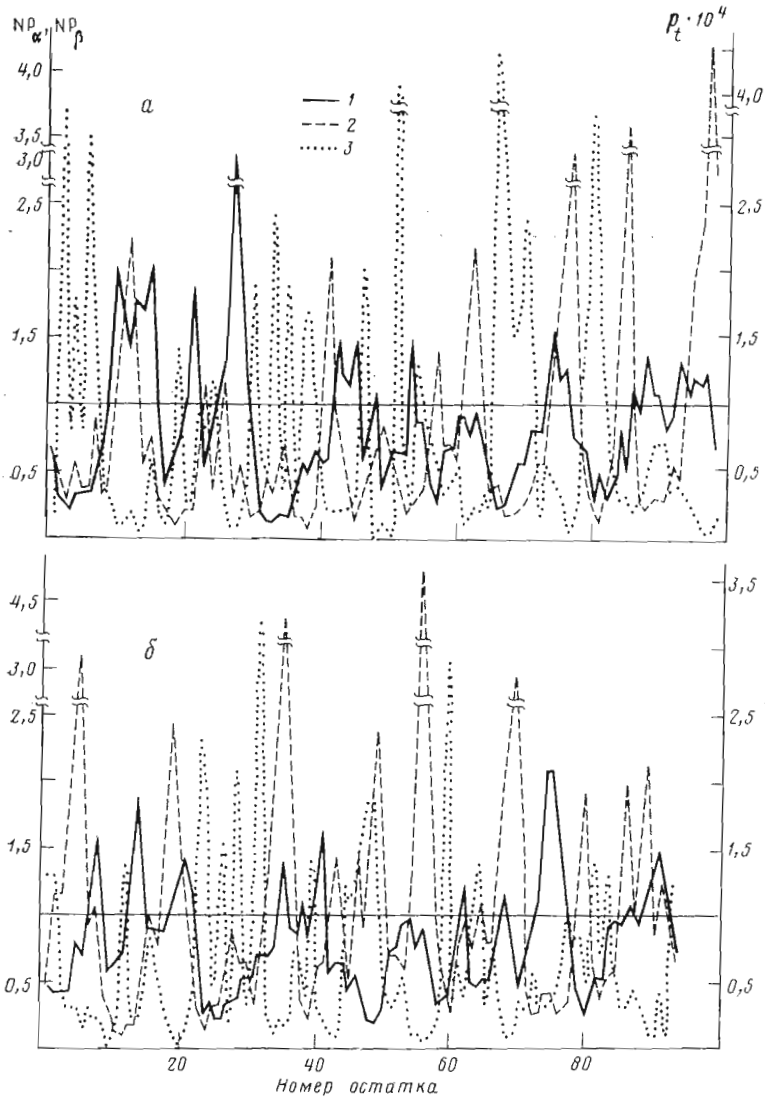


Рис. 6. Произведения конформационных потенциалов (NP_α и NP_β) аминокислотных остатков (1 — α -спираль, 2 — β -структура) и вероятность β -поворотов (3 — p_t) в тетрапептидах РНКазы St (а) и РНКазы Sa (б). Горизонтальная линия — граничное значение предсказываемых конформаций

цепи 59—65, 73—80, 82—88 и 94—101. Вторичная структура в сегментах 9/10—15/16, а также 41—44 может быть описана двумя альтернативными вариантами, допускающими компромисс между α -спиралями и β -структурами. Остатки аминокислот 32—40, 45—58 и 66—72 формируют образование полипептидной цепью РНКазы трех больших петель.

Анализ вторичной структуры РНКазы Sa (рис. 6б, табл. 2) выявляет прежде всего ряд общих для РНКаз актиномицетов топологических элементов белков. В первую очередь к ним относится α -спиральный участок, прогнозируемый для РНКазы Sa в области 12—23 аминокислотной последовательности, и консервативные для обеих РНКаз β -структуры, которые локализованы в РНКазе Sa в сегментах полипептидной цепи 52—59, 66—72, 77—82 и 86—96. Вместе с тем в согласии с данными расчета и в отличие от РНКазы St участки аминокислотных последовательностей РНКазы Sa 2—9 и 32—39 имеют конформацию β -структуры, а предсказываемая β -цепь РНКазы Sa 52—59 может быть продлена в N-концевой части с включением в нее дополнительного элемента аминокислотной последовательности белка 46—51. В участке полипептидной

Значения средних потенциалов в конформациях α -спирали (P_α), β -структуры (P_β) и β -поворота (P_l) для тетрапептидов РНКаз St и Sa

Номер остатка	РНКаз St			РНКаз Sa		
	P_α	P_β	P_l	P_α	P_β	P_l
2	0,81	0,83	1,23			
4	0,78	0,92	1,29			
6	0,79	0,81	1,35			
23				0,94	0,72	1,28
24				0,73	0,65	1,49
26				0,71	0,81	1,30
28				0,74	1,04	1,17
30	0,95	0,65	1,22			
35	0,63	1,01	1,33			
38	0,91	0,55	1,32			
39				0,98	0,73	1,17
44				0,93	1,03	1,01
46	0,93	0,73	1,20			
51	0,87	0,89	1,19			
54	1,03	0,78	1,04			
59				0,85	0,83	1,18
63				0,84	0,95	1,11
64				0,80	1,01	1,11
66	0,68	0,81	1,37			
67	0,73	0,65	1,49			
68	0,84	0,64	1,48			
69	0,89	0,67	1,36			
70	0,89	0,69	1,36			
71	0,99	0,76	1,16			
80	0,68	0,70	1,53			
83				0,82	0,91	1,28

цепи РНКазы Sa 74—77 нельзя исключить также наличия одного витка α -спирали. Подобно РНКазе St в сегментах РНКазы Sa 23—31 и 59—66 сконцентрированы β -повороты.

Конформационный анализ РНКаз актиномицетов не только и не столько подтверждает выявленную ранее гомологию аминокислотных последовательностей ферментов, которая почти очевидна, но позволяет предположить и близость их пространственных структур. В этой связи представляет интерес сравнение данных расчетных предсказаний вторичных структур РНКаз актиномицетов, бактерий и грибов, а также их сопоставление с экспериментальными результатами рентгеноструктурных исследований (рис. 7).

Несмотря на определенную неоднозначность предсказаний, что проявляется при расчете вторичной структуры РНКазы Vi (рис. 7а, см. также [33]), в локализации основных конформационных элементов РНКаз St и Sa актиномицетов, РНКазе T_1 грибов и бактериальной РНКазе Vi можно проследить много общего. Так, С-концевая половина полипептидной цепи белков представлена в основном чередующимися β -структурами, разграниченными β -поворотами, в свою очередь в N-концевой части молекул сосредоточены α -спиральные участки. Значительная часть как β -структур, так и α -спиралей расположена в сходных локусах полипептидных цепей РНКаз.

Результаты рентгеноструктурных исследований РНКаз Vi, T_1 и St [13, 15—18, 34] полностью соответствуют этим данным (рис. 7б). Топология С-концевой половины молекул РНКаз описывается сходной структурой β -слоя, включающего антипараллельное расположение трех (для РНКазы St), четырех (для РНКазы T_1) или пяти (для РНКазы Vi) вытянутых β -конформаций. β -Слой представляет собой наиболее консервативную часть структуры белков и содержит два каталитически важных инвариантных остатка РНКаз — Glu и Arg. Остаток His активного центра ферментов расположен на границе β -слоя. Здесь же (по крайней

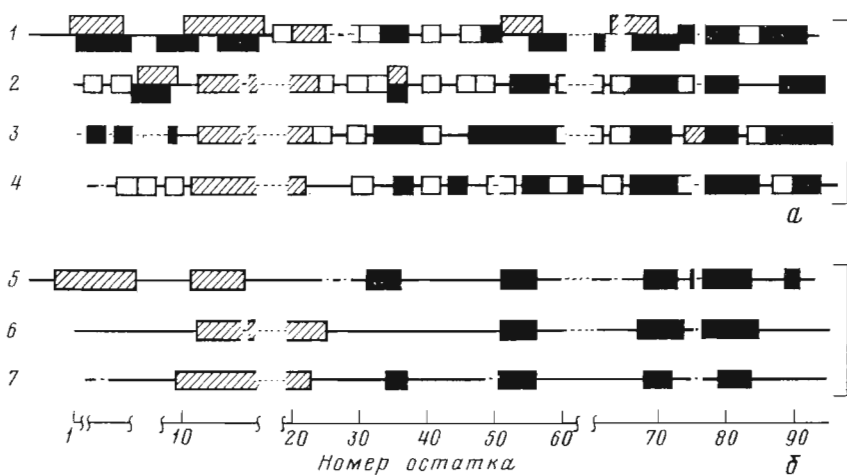


Рис. 7. Сравнение вторичных структур РНКаз микроорганизмов. *a* — локализация вторичных структур, выделенных расчетным методом (1 — РНКазы Vi, 2 — РНКазы Sa, 3 — РНКазы St, 4 — РНКазы T₁ [27]); *b* — данные кристаллографических исследований РНКазы Vi (5), РНКазы St (6) и РНКазы T₁ (7). Приведена нумерация остатков по аминокислотной последовательности РНКазы Sa (рис. 5). Светлые прямоугольники — участки β-поворотов, заштрихованные — α-спирали, зачерненные — β-структуры

мере для РНКаз Vi и T₁) локализована субстратсвязывающая область РНКаз. Все β-структуры, найденные экспериментально, предсказываются теоретическим конформационным анализом. Следует отметить при этом, что две первые гомологичные для РНКаз Vi и T₁ β-конформации прогнозируются также и в обоих РНКазах актиномицетов. Вместе с тем согласно теоретическому предсказанию во всех РНКазах С-концевой сегмент представляет собой участок β-структуры, тогда как данные рентгенографии фиксируют β-структуру только в С-концевой части РНКазы Vi.

Все вместе взятое может в той или иной степени свидетельствовать об эволюционном родстве РНКаз бактерий, актиномицетов и грибов, которое находит свое отражение в сходстве их трехмерных структур. В то же время нельзя не отметить избыточность теоретического предсказания вторичных структур белков настоящим методом (рис. 7). Одновременно анализ структуры С-концевой области РНКаз показывает, что последняя по ходу полипептидной цепи β-структура РНКазы Vi представляет собой компонент антипараллельного β-слоя, взаимодействующий с близрасположенной вдоль цепи β-конформацией, а для РНКазы St С-концевой участок 96—100 контактирует с N-концевым локусом белка 10—15 [15, 18]. Интересно, что, по данным расчета, эта N-концевая область РНКазы St, как и в РНКазе Sa, предсказывается в конформации β-структуры. Результаты рентгенографии также свидетельствуют в пользу того, что структура сегмента РНКазы St 39—45 неупорядоченна, а сегмент 58—63 полипептидной цепи белка образует в молекуле первую β-цепь [18]. Существенно при этом, что они взаимодействуют между собой. Расчет в свою очередь показывает высокую вероятность формирования в участке 41—44 РНКазы St (или соответствующем участке РНКазы Sa 32—39) β-структуры. Важно также, что локализация ее полностью соответствует гомологичным в обоих РНКазах грибов и бактерий β-цепям, включающим остатки аминокислот, ответственных за «узнавание» субстрата. Так же как и в РНКазе St, в РНКазе T₁ N- и С-концевые сегменты молекул сближены и находятся в контакте. В РНКазе T₁ этому благоприятствует дисульфидная связь между остатками Cys⁶ и Cys¹⁰³ [4, 5].

Согласно результатам расчета, в N-концевой половине РНКаз St, Sa и T₁ можно выделить одну подобную для трех ферментов α-спираль, хотя гомология аминокислотных последовательностей РНКаз актиномицетов и грибов в этом участке полипептидной цепи ограничена только двумя инвариантными остатками. Несколько более сложный вариант

распределения α -спиралей предсказывается для РНКазы *Vi* (рис. 7а). Рентгеноструктурный анализ только отчасти подтверждает эти данные, так как, хотя РНКазы *St* и *T₁* действительно содержат одну α -спираль, а РНКазы *Vi* — две (рис. 7б), структуры N-концевых участков РНКаз актиномицетов, грибов и бактерий, по-видимому, значительно дивергировали. Во всех РНКазах микроорганизмов поверхность антипараллельного β -слоя покрывается α -спиральной структурой [13]. В первом приближении можно считать, что такая топология является общей для РНКаз и α -спиральные участки занимают сходное положение. Сравнение РНКаз, однако, показывает, что в случае РНКаз бактерий функцию единственного α -спирального элемента РНКазы *T₁* или РНКазы *St* выполняет не вторая, как это можно было бы ожидать, а первая по ходу полипептидной цепи α -спираль [13, 18].

В заключение представляется очевидным, что внеклеточная гуанил-специфичная РНКазы *Sa* является одним из гомологов семейства РНКаз микроорганизмов, объединяющих про- и эукариотические организмы. Гомология РНКазы *Sa* с РНКазами актиномицетов, бактерий и грибов прослеживается на уровне как первичной, так и вторичной и, по-видимому, третичных структур ферментов. «Вырожденность» структурной гомологии РНКаз является, очевидно, следствием дивергенции эволюционно родственных белков.

Расчет вторичной структуры РНКазы *Sa* может способствовать решению одной из первоочередных задач, встающих при проводимом в настоящее время исследовании пространственной конфигурации данного фермента, а именно — соотнесения экспериментально выделяемых при рентгеноструктурном анализе конформаций белка с конкретными участками его полипептидной цепи.

Экспериментальная часть

В работе использовали TPCK — обработанный трипсин (Worthington, США), карбоксипептидазу Y (Pierce, США), Lys-C-протеиназу (Boehringer, ФРГ), стафилококковую протеиназу V8 (Miles, Англия), флуорескамин (Fluka, ФРГ), глицилглицин (Reanal, Венгрия). Все реагенты и растворители для автоматической деградации по методу Эдмана — фенилтиоцианат, гептан, 0,1 М квадратный буфер, гептафтормасляная кислота, бензол, этилацетат и хлорбутан соответствовали квалификации Sequenal grade (Beckman, США). Иодуксусную кислоту (BDH, Англия) трижды перекристаллизовывали из гептана, а полибрен (Aldrich, ФРГ) перед употреблением очищали тройной экстракцией хлорбутаном. Все растворители, отвечающие маркам х.ч. или ос.ч. (Союзреактив), перегоняли.

Внеклеточную гуанилспецифичную РНКазу Sa (RF 2.7.7.26) актиномицета *S. aureofaciens*, свободную от солей, выделяли как описано в работе [21]. Восстановление и карбоксиметилирование РНКазы проводили в 0,5 М трис-HCl-буфере, pH 8,5, содержащем 5 мМ EDTA и 6 М гуанидингидрохлорид, используя 10-кратный мольный избыток дитиотреита относительно белка и двукратный избыток иодуксусной кислоты по отношению к дитиотреиту [35].

Аминокислотный анализ проводили на анализаторах Biotronic LC-2000 и LC-7000 (ФРГ) с детекцией аминокислот соответственно нингидрином или о-фталевым альдегидом.

Автоматическую деградацию по Эдману проводили на секвенаторе Beckman 890C (США) по модифицированной 0,1 М квадратной программе [8] в присутствии 3 мг полибрена и 100 нмоль глицилглицина, предварительно подвергнутых пяти полным циклам секвенирования. N-Концевые остатки пролина на стадиях 12 и 13 секвенирования белка отщепляли двукратной обработкой соответствующих фенилтиокарбамилпроизводных пептидов гептафтормасляной кислотой в стандартизованных условиях автоматической деградации, а остаточные продукты секвенирования РНКазы после проведения 28 и 44 стадий деградации по Эдману блокировали модификацией с флуорескамином [8, 24].

При анализе нефракционированных пептидных гидролизатов РНКазы Sa осуществляли 21 полный цикл автоматической деградации белка, после чего процесс секвенирования прерывали, проводили двукратную обработку продуктов флуорескамином в реакционной ячейке секвенатора

[8, 24] с промежуточным и последующим «нулевым» (без добавления фенилтиоцианата) циклом эдмановской деградации, а затем еще один полный цикл секвенирования. На этой стадии — дез-(1-21)-СМ-РНКаза Sa — модифицированный белок гидролизовали трипсином или стафилококковой протеиназой в ячейке секвенатора в 0,1 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, рН 8,5, при 37° С в течение 8 или 4 ч и соотношении ферментов к субстрату соответственно 1 : 50 или 1 : 30. После высушивания препараты подвергались дальнейшему секвенированию, начиная с цикла 23 (1-й цикл автоматической деградации пептидных гидролизатов, см. табл. 1) и далее.

Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли тремя методами: ТСХ [8], ГЖХ [36], а также после обратного гидролиза производных 5 н. НI при 150° С в течение 24 ч. ГЖХ проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5710A (США).

Конверсию анилинтиазолиновых производных аминокислот, полученных в ходе деградации по Эдману, проводили в 1 н. НСI при 80° С в присутствии 0,3% этилмеркаптана в течение 10 мин с последующей экстракцией производных из водного раствора этилацетатом. Водные фракции анализировали на содержание аргинина и гистидина. Выход аминокислот оценивали, вводя во фракции анилинтиазолиновых производных в качестве внутреннего стандарта фенилтиогидантоин норлейцина. При определении количеств фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на определенной стадии секвенирования вводили поправку, учитывающую теоретический фон «остаточных» аминокислот при найденных экспериментально постадийном (97%) и начальном (70%) выходах эдмановской деградации [8, 20].

Протеолиз СМ-РНКаза Sa карбоксипептидазой Y проводили в 50 мМ N-этилморфолин-ацетатном буфере при рН 5,5, температуре 37° С и соотношении фермент — субстрат 1 : 75. Кинетику расщепления белка прослеживали, анализируя аликвоты реакционной смеси, содержащей Nle в качестве внутреннего стандарта.

Расчет вторичных структур РНКаза проводили методом Дюфтона и Хайдера [32], основанным на анализе аминокислотной последовательности белков согласно численным значениям конформационных параметров аминокислотных остатков, выведенных Чоу и Фасманом [31]. Алгоритм предсказания в белках α -спиралей, β -структур и β -поворотов описан в работе [27].

ЛИТЕРАТУРА

1. Безбородова С. И., Безбородов А. М. // Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979. С. 92—145.
2. Hartley R. W., Barker E. A. // Nature New Biol. 1972. V. 235. № 53. P. 15—16.
3. Aphanasenko G. A., Dudkin S. M., Kaminir L. V., Leshchinskaya I. B., Severin E. S. // FEBS Lett. 1979. V. 97. № 1. P. 77—80.
4. Takahashi K. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. № 10. P. 4117—4119.
5. Takahashi K. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 3. P. 815—817.
6. Watanabe H., Ohgi K., Irie M. // J. Biochem. 1982. V. 91. № 5. P. 1495—1509.
7. Bezborodova S. I., Khodova O. M., Stepanov V. M. // FEBS Lett. 1983. V. 159. № 12. P. 256—258.
8. Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. И. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 334—345.
9. Hashimoto J., Takahashi K. // J. Biochem. 1974. V. 76. № 6. P. 1359—1361.
10. Sato S., Uchida T. // Biochem. J. 1975. V. 145. № 2. P. 353—360.
11. Shlyapnikov S. V., Bezborodova S. I., Kulikov V. A., Yakovlev G. I. // FEBS Lett. 1986. V. 196. № 1. P. 29—33.
12. Hirabayashi J., Yoshida H. // Biochem. Internat. 1983. V. 7. № 2. P. 255—262.
13. Hill G., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsuo Y., Nakamura K., Borisov V., Tishenko G., Polyakov K., Pavlovsky A. // Trends Biochem. Sci. 1983. V. 8. № 10. P. 364—369.
14. Поляков К. М., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородов С. И., Вайнштейн Б. К. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. № 6. С. 1383—1386.
15. Pavlovsky A. G., Vagin A. A., Vainstein B. K., Cherpurnova N. K., Karpeisky M. Ya. // FEBS Lett. 1983. V. 162. № 1. P. 167—170.
16. Heinemann U., Saenger W. // Nature. 1982. V. 299. № 5878. P. 27—31.
17. Manguen Y., Hartley R. W., Dodson E. J., Dodson G. G., Bricogne G., Chothia C., Jack A. // Nature. 1982. V. 297. № 5862. P. 162—164.

18. Nakamura K. T., Iwahashi K., Yamamoto Y., Jitaka Y., Yoshida Y. // Nature. 1982. V. 299. № 5883. P. 564—566.
19. Yoshida N., Sasaki A., Rashid M. A., Otsuka H. // FEBS Lett. 1976. V. 64. № 1. P. 122—125.
20. Шляпников С. В., Безбородова С. И., Куликов В. А., Яковлев Г. И. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 172—184.
21. Gasperik J., Prescakova S., Zelinka J. // Biologia (Bratislava). 1982. V. 37. № 3. P. 377—381.
22. Gasperik J., Muranova M., Suranova B., Zelinka J., Kostka V. // Biologia (Bratislava). 1982. V. 37. № 8. P. 769—775.
23. Jekel P. A., Weijer W. J., Beintema J. J. // Anal. Biochem. 1983. V. 134. № 2. P. 347—354.
24. Bhowm A. S., Bennet J. C., Morgan P. H., Mole J. E. // Anal. Biochem. 1981. V. 112. № 1. P. 158—162.
25. Both V., Zelinkova E., Gasperik J., Zelinka J., Schindelmeiser J., Witzel H. // Ribosomes and RNA metabolism/Ed. Zelinka J., Balan J. Publish. house Slovak Acad. Sci., 1976. P. 119—126.
26. Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya., Bezborodova S. I., Beletskaya O. P., Sakharovskiy V. G. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 109. № 1. P. 75—85.
27. Шляпников С. В., Куликов В. А., Яковлев Г. И. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 346—357.
28. Beintema J. J., Lenstra J. A. // Macromolecular sequences in systematic and evolutionary biology/Ed. Goodman M. N. Y.: Plenum Press, 1982. P. 43—73.
29. Beintema J. J., Vanderlaan J. M. // FEBS Lett. 1986. V. 194. № 2. P. 338—342.
30. Hayakawa S., Takahashi K. // J. Biochem. 1973. V. 73. № 6. P. 1075—1081.
31. Chou P. Y., Fasman G. D. // Adv. Enzymol. 1978. V. 47. P. 45—148.
32. Dufton M. J., Hider R. C. // J. Mol. Biol. 1977. V. 115. № 2. P. 177—193.
33. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Камшир Л. Б., Северин Е. С., Голубенко Н. А. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 2. С. 187—202.
34. Sugio S., Amisaki T., Ohishi H., Tomita K., Heinemann U., Saenger W. // FEBS Lett. 1985. V. 181. № 1. P. 129—132.
35. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 2. P. 622—627.
36. Pisano J. J., Bronzert T. J. // J. Biol. Chem. 1969. V. 224. № 20. P. 5597—5607.

Поступила в редакцию
8.X.1986

**EXTRACELLULAR GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE Sa FROM ACTINOMYCETE
STREPTOMYCES AUREOFACIENS. PRIMARY STRUCTURE AND
HOMOLOGY WITH RIBONUCLEASES OF BACTERIA AND FUNGI**

SHLYAPNIKOV S. V., BOTH V. *, KULIKOV V. A., DEMENTIEV A. A.,
ZELINKA J.*

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
**Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*

The complete amino acid sequence of a guanyl-specific RNase from *Streptomyces aureofaciens* has been established using a rapid method of primary structure analysis which eliminates the peptide fractionation. The automated Edman degradation of the carboxymethylated RNase Sa and of non-fractionated peptide mixtures produced by tryptic and staphylococcal protease digests of the modified protein were used. The RNase contains 96 amino acid residues, M_r 10 566. The secondary structures of RNase Sa and microbial RNases have been calculated using a modified Chou — Fasman procedure. A comparison of the primary and secondary structures of the RNases revealed different degrees of sequence homology and a similar distribution of predicted structural regions (α -helices, β -structure and β -turn). The predicted secondary structure patterns are discussed in the light of the RNase X-ray analysis data.