



УДК 577.152.312*73'14:577.112.5

РИБОНУКЛЕАЗА F₁ *FUSARIUM LATERITIIUM*.
ВЫДЕЛЕНИЕ, СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ
И АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

Безбородова С. И., Чепурнова Н. К. *, Шляпников С. В. *

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов Минмедбиопрома, Москва;

* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Проведено выделение внеклеточной РНКазы F₁ гриба *Fusarium lateritium* с выходом по активности 89% и степенью очистки 300. Удельная активность фермента 1420 ед. акт./мг белка. РНКазы F₁ гомогенна, согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле, и является гуанилспецифичным ферментом (КФ 3.1.27.3). Методом автоматической деградации по Эдману нефракционированных продуктов расщепления белка стафилококковой протеиназой, трипсином, а также гидроксиламином определена полная аминокислотная последовательность РНКазы. Показано, что под действием гидроксилamina N-концевой остаток РНКазы F₁, остаток пироглутаминовой кислоты, превращается в соответствующее производное гидроксамовой кислоты, доступное для эдмановской деградации. РНКазы F₁ содержит 105 остатков аминокислот с M_r 10 852 и обладает значительной структурной гомологией с внеклеточной гуанилспецифичной РНКазой F₁ *F. moniliforme*, отличаясь от нее наличием 15 аминокислотных замен на периферийных участках полипептидной цепи белка, не затрагивающих область активного центра фермента.

В последнее десятилетие успешно развиваются сравнительно-эволюционные исследования внеклеточных РНКаз микроорганизмов (бактерий, актиномицетов и микромицетов) на структурном уровне. Наиболее изученными представителями внеклеточных РНКаз микроорганизмов, для которых известны аминокислотные последовательности, являются: две бактериальные РНКазы — *Bacillus amyloliquefaciens* [1] и *B. intermedius* [2]; две РНКазы актиномицетов — *Streptomyces erythreus* [3] и *S. aureofaciens* [4]; восемь РНКаз микроскопических грибов — РНКазы T₁ *Aspergillus oryzae* [5], РНКазы Pb₁ *Penicillium brevicompactum* [6], РНКазы C₂ *Asp. clavatus* [7], РНКазы Ms *Asp.saitoi* [8], РНКазы Pch₁ *Pen. chrysogenum* [9], РНКазы F₁ *Fusarium moniliforme* [10], РНКазы Th₁ *Trichoderma harzianum* [11] и РНКазы Ap₁ *Asp. pallidus* [12]. Вместе с тем чрезвычайная многочисленность обособленных «царств» прокариотических и низших эукариотических организмов и огромное многообразие ныне существующих видов обеспечивают широкую возможность поиска новых продуцентов внеклеточных РНКаз, выделения и анализа индивидуальных ферментов из различных таксономических групп грибов, определения первичных структур белков и исследования степени филогенетического родства отдельных организмов.

Несмотря на широкое распространение в почвах СССР грибов рода *Fusarium* и сравнительно давно установленную их способность секретировать внеклеточные РНКазы, последние тем не менее изучены мало. Относительно полную биохимическую характеристику имеют только два фермента: РНКазы F₁ [10] и РНКазы Fs, продуцируемая культурой *F. semitectum* [13].

Целью данной работы было выделение в гомогенном состоянии внеклеточной РНКазы F₁ микромицета *F. lateritium*, предварительное описание ее некоторых каталитических свойств и определение полной аминокислотной последовательности фермента.

Предварительная проверка способности грибов рода *Fusarium* продуцировать внеклеточные РНКазы при росте на среде с ограниченным со-

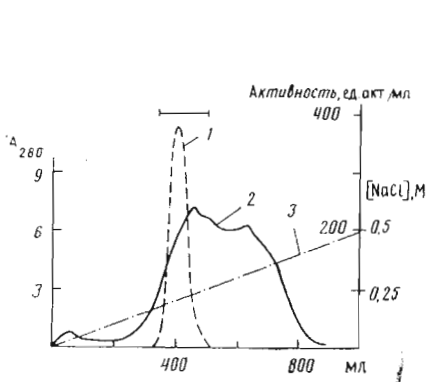


Рис. 1

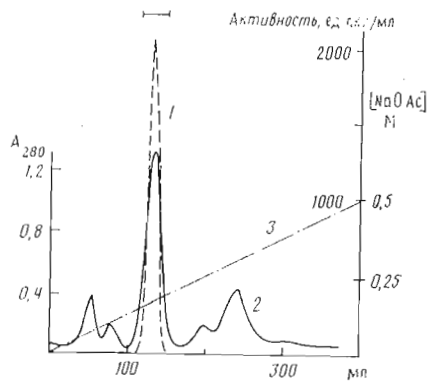


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография РНКазы F_1 на колонке (5 × 20 см) с ДЕАЕ-целлюлозой в градиенте концентрации NaCl в 50 мМ трис- HCl-буфере, pH 7,7. Скорость 150 мл/ч. 1 — активность фермента, 2 — A_{280} , 3 — градиент NaCl. Вверху показаны границы объединенной фракции, содержащей РНКазу F_1

Рис. 2. Хроматография РНКазы F_1 на колонке (2,5 × 12 см) с СМ-целлюлозой в градиенте концентрации (20—500 мМ) натрий-ацетатного буфера, pH 4,2. Скорость 50 мл/ч. Обозначения — см. рис. 1

держанием фосфата показала, что практически все представители различных видов этого рода, имеющиеся в нашем распоряжении в разные периоды времени, секретируют ферменты, активность которых оптимальна в слабокислой и слабощелочной среде [14]. Активность внеклеточной РНКазы в культуральной жидкости *F. lateritium* при выращивании на видоизмененной среде Огато [15] достигала к моменту слива после 66 ч роста ~15 ед. акт./мл.

РНКазы F_1 сорбируется на ДЕАЕ-целлюлозе при pH > 7,0 и на СМ-целлюлозе в слабокислой среде подобно большинству уже полученных и охарактеризованных гуанилспецифичных РНКаз грибов с низкой изоэлектрической точкой [5—7, 9, 12]. Поэтому для очистки фермента в данной работе использовали традиционную схему, включающую три основных этапа: высаливание белков из культуральной жидкости сульфатом аммония с целью их концентрирования и последующее проведение двух стадий ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-и СМ-целлюлозах.

После высаливания РНКазы F_1 сульфатом аммония (90% от насыщения) дальнейшая очистка фермента (рис. 1, 2) проходила практически без потерь ферментативной активности, а на отдельных стадиях, в частности при ионообменной хроматографии, сопровождалась даже незначительной активацией РНКазы, связанной, по-видимому, с сорбцией ДЕАЕ-целлюлозой веществ, частично ингибирующих фермент в исходной фракционируемой смеси (табл. 1). Аналогичный эффект наблюдался ранее и при выделении других внеклеточных гуанилспецифичных РНКаз грибов [6, 7, 11, 12]. В результате получено 18 мг фермента с выходом по

Таблица 1

Очистка РНКазы F_1

Стадия очистки	Объем, мл	Количество белка, мг	Активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Степень очистки	Выход, %	
						активность	белок
Осаждение сульфатом аммония	100	6000	28 700	4,8	1	100	100
Хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе	160	576	33 600	58,3	12,1	117	9,6
Хроматография на СМ-целлюлозе	30	24	32 400	1350	281	112	0,4
Ультрафильтрация, обессоливание	4	18	25 560	1420	296	89	0,3

активности 89% и степенью очистки 296 раз. Удельная активность препарата РНКазы Fl_1 составляла 1420 ед. акт./мг белка.

УФ-спектр РНКазы Fl_1 имеет два характеристических экстремума: при 278 и 250—252 нм (рис. 3) с $A_{\max}/A_{\min} = 2,2$. Последняя величина близка по значению к соотношению экстремумов поглощения, найденному для внеклеточных РНКаз пенициллов [6, 9] и является, на

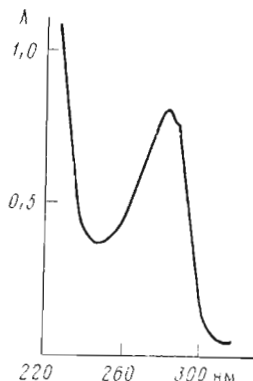


Рис. 3

Рис. 3. УФ-спектр РНКазы Fl_1 . Условия: 10 мМ трис-НСI-буфер, pH 7,0, с 30 мМ NaCl. Концентрация РНКазы 0,8 мг/сл

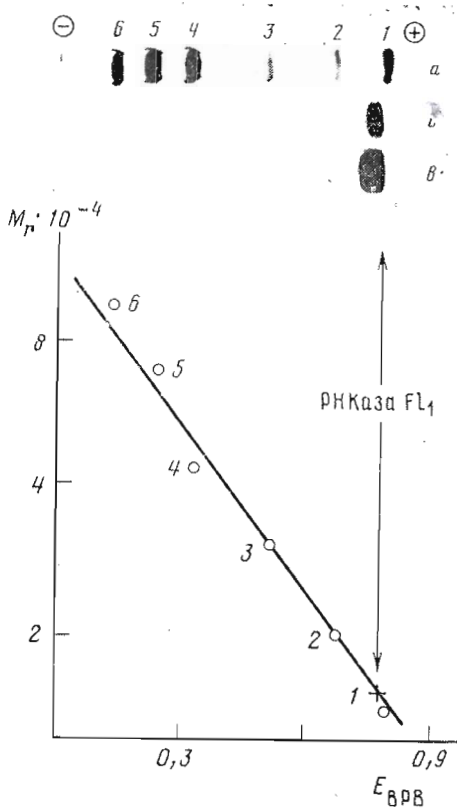


Рис. 4

Рис. 4. Электрофорез РНКазы Fl_1 в 12,5% ПААГ. Условия: 0,1% додецилсульфат натрия, pH 8,5. Вверху показана детекция в геле смеси стандартных белков (1—6) (а) и РНКазы Fl_1 (б — 20 мкг, в — 40 мкг) кумасси голубым R-250. Внизу приведена зависимость $\lg M_r$ белков от их электрофоретической подвижности относительно бромфенолового синего (ВРВ). Стандартные белки (M_r): 1 — α -лактальбумин (14 400), 2 — ингибитор трипсина (20 100), 3 — карбоангидраза (30 000), 4 — овальбумин (43 000), 5 — альбумин (67 000), 6 — фосфоорилаза b (94 000)

наш взгляд, достаточно убедительным критерием высокой чистоты белкового препарата. Согласно спектральным данным, РНКазы Fl_1 не содержит остатков триптофана.

РНКазы Fl_1 гомотетна согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 4). По электрофоретической подвижности РНКазы Fl_1 имеет молекулярную массу $\sim 15 000$ Да. При этом надо, однако, иметь в виду, что «кислые» низкомолекулярные РНКазы грибов обладают «аномальными» электрофоретическими свойствами, которые проявляются, как правило, в завышении значений их молекулярных масс, определяемых настоящим методом [12].

Исследование субстратной специфичности РНКазы Fl_1 показало, что в ряду высокомолекулярных гомеолигорибонуклеотидов — poly(I), poly(A), poly(U) и poly(C) — РНКазы быстро гидролизует только poly(I), за 15 мин превращая полирибонуклеотид в инозин-2',3'-циклофосфат с последующим более медленным гидролизом циклического производного (~ 45 мин) до 3'-инозиновой кислоты. В серии различных нуклеозид -2',3'-циклофосфатов гидролизу РНКазой подвергались лишь гуанозин- и инозин-2',3'-циклофосфаты, тогда как соответствующие производные уридина и цитозина в условиях эксперимента оказались устойчивыми к действию фермента. Эти результаты позволяют отнести исследуемый фермент к гуа-

Аминокислотный состав РНКазы F₁, моль/моль белка

Аминокислота	Номер опыта			Среднее значение	РНКазы F ₁ [10]
	1	2	3		
Asx	10,2	10,5	10,4	10/11	15
Thr	9,9	10,0	9,8	10/11	11
Ser	10,1	10,0	11,4	11/12	10
Glx	8,5	8,6	9,0	9	9
Pro	5,0	5,6	5,3	5/6	5
Gly	12,2	12,4	12,0	12	14
Ala	12,8	12,7	12,5	13	12
½Cys	3,4 *	3,6 *	3,5 *	4	4
Val	3,5	3,4	3,6	4	6
Ile	2,7	2,4	2,8	3	3
Leu	0,4	0,2	0,5	0	0
Tyr	6,8	6,7	6,9	7/8	9
Phe	3,7	3,8	3,6	4	4
Lys	0,5	0,5	0,4	0/1	1
His	2,0	1,9	2,0	2	2
Arg	3,3	3,2	3,2	3	2
Trp	0 **	0 **	0 **	0	0
Met	0	0	0	0	0
Общее содержание				97/103	106

* Определено в форме Cys(Cm).

** Определено при гидролизе метансульфоновой кислотой.

нилспецифичным РНКазам (КФ 3.1.27.3). Оптимум pH расщепление РНК у РНКазы F₁ в трис-ацетатном буфере равен 7,6.

Сравнение аминокислотного состава двух РНКаз грибов рода *Fusarium* — РНКазы F₁ и РНКазы F₁ — выявляет определенное сходство структур двух белков: одинаковое содержание в РНКазах остатков Thr, Glx, Pro, Cys, Phe и His и отсутствие в них остатков Met, Trp и Leu (табл. 2). N-Концевым остатком РНКазы F₁ является остаток пироглутаминовой кислоты [10]. В РНКазе F₁ N-концевой остаток не был обнаружен ни одним из используемых в работе стандартных методов анализа. Отсюда можно предположить, что α-аминогруппа N-концевого аминокислотного остатка РНКазы F₁ или модифицирована (например, вследствие ацилирования или алкилирования), или по аналогии с РНКазой F₁ [10] N-концевым аминокислотным остатком молекулы РНКазы F₁ является остаток Gln, который, как и в случае РНКазы F₁, претерпевает циклизацию в пирролидонкарбоновое производное.

Первый этап расшифровки первичной структуры РНКазы F₁ включал в себя проведение автоматической деградации по методу Эдмана нефракционированных пептидов, полученных при гидролизе РНКазы (после предварительной безрезультатной попытки секвенирования интактного восстановленного белка) трипсином.

Триптический гидролиз РНКазы F₁ при наличии в белке трех остатков Arg в общем случае должен сопровождаться образованием четырех фрагментов белка. Анализ нефракционированного триптического гидролизата РНКазы показывает (табл. 3), что только три пептида, содержащие соответственно 45, 14 и 30 остатков аминокислот, подвергаются автоматической эдмановской деградации. N-Концевой триптический пептид РНКазы F₁ в силу указанных выше причин был устойчив к деградации по методу Эдмана.

Одним из частных выводов, вытекающих из рассмотрения данных автоматической деградации по методу Эдмана смеси пептидов триптического гидролизата белка, явилось однозначное определение аминокислотной последовательности сегмента полипептидной цепи РНКазы на 31—45-й стадиях секвенирования соответствующего гидролизата (см. табл. 3, остатки 47—61 на рис. 5). Существенно, что в этом участке структуры

Автоматическая деградация по Эдману продуктов гидролиза
S-карбоксиметилированной РНКазы Г₁ стафилококковой протеиназой
и трипсином

Цикл деградации	Аминокислота (выход, ммоль; метод идентификации ¹)					
	Гидролиз РНКазы трипсином			Гидролиз РНКазы стафилококковой протеиназой		
1	Ala (52;Г)	Thr (28;A)	Val (61;Г)	Gly (43;A)	Phe ² (58;Г)	Phe ² (58;Г)
2	Ala (54;Г)	Gly (35;A)	Ile (56;Г)	Phe (98;Г)	Ala (17;Г)	Pro (35;Г)
3	Ala (58;Г)	Gly (35;A)	Ile (58;Г)	Asp (49;A)	Val (18;Г)	Ile (34;Г)
4	Asn ² (68;A)	Val (52;Г)	Asn ² (68;A)	Phe (65;Г)	Asn (9;A)	Arg (-;A)
5	Ala (49;Г)	Tyr (40;Г)	Thr (23;A)	Ala (56;Г)	Gly (7;A)	Thr (10;A)
6	Ala (42;Г)	Ser ² (-;Г)	Ser ² (-;Г)	Val (59;Г)	Pro (13;Г)	Gly (18;A)
7	Cys ² (37;A)	Gly (23;A)	Cys ² (37;A)	Asn (28;A)	Tyr (9;A)	Gly (18;A)
8	Gln ² (52;A)	Gly (26;A)	Gln ² (52;A)	Gly (20;A)	Gln (8;A)	Val (29;Г)
9	Tyr ² (56;Г)	Ser (17;A)	Tyr ² (56;Г)	Pro (43;Г)	Glu (7;A)	Tyr (16;Г)
10	Tyr (33;Г)	Pro (31;Г)	Ala (35;Г)	Tyr (37;Г)	Phe (6;Г)	Ser (12;A)
11	Gln (22;A)	Gly ² (30;A)	Gly ² (30;A)	Gln (19;A)	Pro (5;Г)	Gly (14;A)
12	Ser (-;Г)	Ala ² (71;Г)	Ala ² (71;Г)	Glu (23;A)	Ile (4;Г)	Gly (13;A)
13	Asp ² (54;A)	Asp ² (54;A)	Ile (37;Г)	Phe (24;Г)	Arg (-;A)	Ser (11;A)
14	Asp (29;A)	Arg (-;A)	Thr (13;A)	Pro ² (40;Г)		Pro ² (40;Г)
15	Thr (15;A)		His (-;A)	Ile (21;Г)		Gly (14;A)
16	Ala (28;Г)		Thr (14;A)	Arg (-;A)		Ala (17;Г)
17	Gly ² (20;A)		Gly ² (20;A)	Thr (11;A)		Asp (9;A)
18	Ser (-;Г)		Ala (29;Г)	Gly (13;A)		Arg (-;A)
19	Thr (11;A)		Ser (14;A)	Gly (13;A)		Val (17;Г)
20	Thr (9;A)		Gly (13;A)	Val (17;Г)		Ile (14;Г)
21	Tyr (17;Г)		Asn (18;A)	Tyr (9;A)		Ile (16;Г)
22	Pro (20;Г)		Asn (17;A)	Ser (7;A)		Asn (8;A)
23	His (-;A)		Phe (26;Г)	Gly (10;A)		Thr (7;A)
24	Thr (7;A)		Val (21;Г)	Gly (12;A)		Ser (9;A)
25	Tyr (14;Г)		Gly (11;A)	Ser ² (11;A)		Cys ² (11;A)
26	Asn (9;A)		Cys (7;A)	Pro (14;Г)		Gln (6;A)
27	Asn (9;A)		Ser (7;A)	Gly (10;A)		Tyr (8;A)
28	Tyr (12;A)		Asn (10;A)	Ala ² (23;Г)		Ala ² (23;Г)
29	Glu (12;A)		Ser (5;A)	Asp (7;A)		Gly (5;A)
30	Gly (5;A)		Thr (4;A)	Arg (-;A)		Ala (9;Г)
31	Phe (16;Г)			Val (9;Г)		Ile (7;Г)
32	Asp (10;A)			Ile (6;Г)		Thr (4;A)
33	Phe (14;Г)					
34	Ala (11;Г)					
35	Val (13;Г)					
36	Asn (8;A)					
37	Gly (5;A)					
38	Pro (7;Г)					
39	Tyr (5;A)					
40	Gln (4;A)					
41	Glu (6;A)					
42	Phe (7;Г)					
43	Pro (4;Г)					
44	Ile (6;Г)					
45	Arg (-;A)					

Положение в цепи РНКазы

17-61 62-75 76-105 46-71 49-61 58-89

¹ А, Г — методы количественного определения аминокислот; А — аминокислотный анализ, Г — ГЖХ.

² Выход аминокислот не дифференцирован для индивидуальных пептидов.

РНКазы локализованы последовательность Asn-Gly, один из двух обнаруженных в молекуле белка остатков глутаминовой кислоты (Glu⁵⁷ на рис. 5, второй остаток глутаминовой кислоты найден на 29-й стадии секвенирования триптических пептидов) и, наконец, один из четырех остатков аспарагиновой кислоты (32-я стадия секвенирования, табл. 3; Asp⁴⁸ на рис. 5). Поэтому дальнейшая расшифровка полной аминокислот-

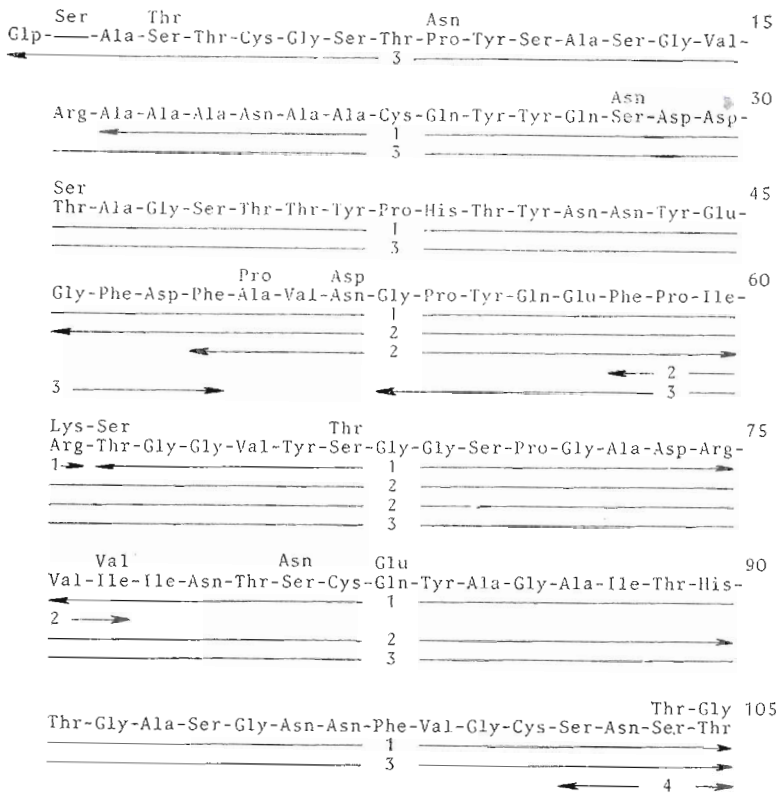


Рис. 5. Первичная структура РНКазы F₁. Приведена нумерация остатков по аминокислотной последовательности РНКазы F₁. Показаны структуры, установленные при секвенировании нефракционированных продуктов гидролиза РНКазы трипсином (1), стафилококковой протеиназой (2) и гидроксиламином (3). 4 — данные исследования кинетики протеолиза РНКазы карбоксипептидазой Y. Вверху представлена локализация остатков РНКазы F₁, отличных от РНКазы F₁

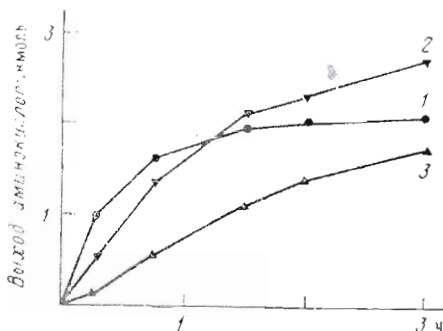
ной последовательности РНКазы F₁ базировалась на исследовании структуры фрагментов белка, полученных при расщеплении молекулы РНКазы по остаткам Glu/Asp стафилококковой протеиназой [16], а также при расщеплении белка по связи Asn—Gly под действием гидроксилamina [17].

Данные автоматической эдмановской деградации продуктов гидролиза РНКазы F₁ стафилококковой протеиназой (табл. 3) показали, что молекула РНКазы расщепляется ферментом в трех сайт-специфических центрах, два из которых представляют собой остатки глутаминовой кислоты (29, 41 и 32-я стадии деградации триптического гидролизата, табл. 3; Glu⁴⁵, Glu³⁷ и Asp⁴⁸ на рис. 5 соответственно).

Расшифровка первичной структуры РНКазы F₁ на этом этапе работы основывалась на сравнительном анализе продуктов эдмановской деградации пептидного гидролизата РНКазы, полученного под действием стафилококковой протеиназы, и продуктов триптического гидролизата белка [9]. При этом продукты 1-го цикла деградации по Эдману пептидов гидролиза РНКазы стафилококковой протеиназой сопоставляли с продуктами 30, 33 и 42-го циклов секвенирования нефракционированных триптических пептидов, непосредственно примыкающих к специфическим центрам расщепления РНКазы стафилококковой протеиназой; продукты 2-го цикла — с продуктами 31, 34 и 43-го циклов и т. д.

Сравнительный анализ результатов автоматической деградации по Эдману двух ферментативных гидролизатов РНКазы F₁ позволил: а) сделать вывод о неполноте расщепления белка протеиназой из *St. aureus* по указанным выше остаткам дикарбоновых аминокислот, что привело к образованию пептидов с перекрывающимися аминокислотными последовательностями; б) определить последовательность 28 аминокислотных остатков (остатки 62—89, рис. 5), примыкающих к С-концевой области

Рис. 6. Кинетика гидролиза S-карбоксиметил-РНКаза F₁ карбоксипептидазой Y. Условия: 50 мМ N-этилморфолин-ацетатный буфер, pH 7,5; 37° С, E/S = 1 : 100. Выход аминокислот рассчитывали относительно αAbu, используемой в качестве внутреннего стандарта. 1 — Thr, 2 — Ser, 3 — Asn



фрагмента, структура которого расшифрована ранее при секвенировании триптического гидролизата белка (остатки 47—61, рис. 5), и двух аминокислотных остатков, примыкающих к его N-концевой области (остатки 45, 46, рис. 5).

В состав фрагмента полипептидной цепи РНКаза F₁ с установленной таким образом структурой (остатки 45—89, рис. 5) полностью входит один из исследуемых триптических пептидов (остатки 62—75, рис. 5) и часть (14 остатков, остатки 76—89, рис. 5) N-концевой последовательности другого триптического пептида. Исключая эти аминокислотные последовательности из результатов секвенирования триптического гидролизата белка (табл. 3), можно однозначно вывести N-концевую последовательность (14 остатков) третьего триптического пептида. Поскольку при гидролизе РНКаза F₁ трипсином должны образоваться всего четыре пептида, один из которых, N-концевой, имеет заблокированную α-аминогруппу N-концевого остатка, полученные результаты позволяют сделать вывод, что установленная N-концевая последовательность (14 остатков, остатки 17—30, рис. 5) принадлежит триптическому пептиду, занимающему второе в порядке следования положение в полипептидной цепи РНКаза F₁. C-Концевая последовательность этого пептида была расшифрована ранее (остатки 45—61, рис. 5).

Исследование кинетики протеолиза S-карбоксиметилированной РНКаза F₁ карбоксипептидазой Y (рис. 6) позволило установить C-концевую аминокислотную последовательность белка — Ser-Asn-Ser-Thr (остатки 102—105 на рис. 5). Сопоставление найденной C-концевой последовательности аминокислот в РНКазе с данными автоматической эдмановской деградации смеси триптических пептидов на стадиях 27—30 (табл. 3), с одной стороны, подтверждает установленную ранее локализацию в первичной структуре РНКаза остатков глутаминовой кислоты и глицина (29-я и 30-я стадии секвенирования триптического гидролизата белка, см. также остатки Glu⁴⁵ и Gly⁴⁶ на рис. 5) и, с другой — приводит к соответствующему отнесению остатков аспарагина и тирозина, идентифицируемых на предыдущих стадиях секвенирования триптического гидролизата белка (остатки Asn⁴³ и Tyr⁴⁴ на рис. 5).

Таким образом, три участка первичной структуры РНКаза остаются нерасшифрованными на данном этапе исследования. В первую очередь это относится к N-концевому сегменту молекулы белка, вся информация о структуре которого ограничена предположением о наличии в нем C-концевого остатка Arg и N-концевого остатка с заблокированной α-аминогруппой. Аминокислотная последовательность двух других рассматриваемых участков молекулы РНКаза F₁, один из которых (остатки 90—101 на рис. 5) примыкает к C-концевому фрагменту полипептидной цепи белка, а второй локализован между двумя расшифрованными, внутренними сегментами структуры РНКаза (остатки 17—30 и 43—89 соответственно, рис. 5), представлена данными секвенирования смеси пептидов триптического гидролизата белка на стадиях 15—26 (см. табл. 3). При этом, однако, возможно равновероятное отнесение остатков аминокислот, идентифицируемых при эдмановской деградации двух соответствующих пептидов, к тому или иному положению в цепи белка.

Автоматическая деградация по Эдману продуктов гидролиза
S-карбоксиметилированной РНКазы Fl₁ гидроксиламино *

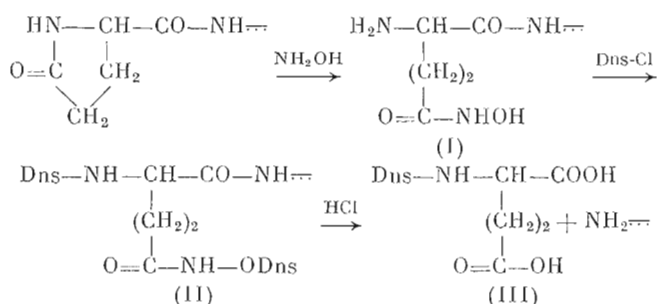
Цикл деградации	Аминокислота (выход, нмоль; метод идентификации)		Цикл деградации	Аминокислота (выход, нмоль; метод идентификации)	
1	Glu (29; A)	Gly (56; A)	28	Ser (5; A)	Thr (11; A)
2	Ala (37; Г)	Pro (74; Г)	29	Asp (9; A)	Ser (9; A)
3	Ser (15; A)	Tyr (60; Г)	30	Asp (11; A)	Cys (10; A)
4	Thr (19; A)	Gln (35; A)	31	Thr (5; A)	Gln (12; A)
5	Cys (13; A)	Glu (31; A)	32	Ala (10; Г)	Tyr (14; A)
6	Gly (21; A)	Phe (65; Г)	33	Gly (7; A)	Ala (16; Г)
7	Ser (14; A)	Pro (61; Г)	34	Ser (4; Г)	Gly (11; A)
8	Thr (15; A)	Ile (60; Г)	35	Thr (5; A)	Ala (14; Г)
9	Pro (26; Г)	Arg (-; A)	36	Thr (5; A)	Ile (15; Г)
10	Tyr (21; A)	Thr (25; A)	37	Tyr (6; A)	Thr (7; A)
11	Ser (10; A)	Gly (31; A)	38	Pro (7; Г)	His (-; A)
12	Ala (22; Г)	Gly (33; A)	39	His (-; A)	Thr (8; A)
13	Ser (16; A)	Val (42; Г)	40	Thr (4; A)	Gly (7; A)
14	Gln (14; A)	Tyr (31; Г)	41	Tyr (5; A)	Ala (12; Г)
15	Val (21; Г)	Ser (18; A)	42	Asn (4; A)	Ser (5; A)
16	Arg (-; A)	Gly (27; A)	43	Asn (4; A)	Gly (8; A)
17	Ala (17; Г)	Gly (27; A)	44	Tyr (5; A)	Asn (7; A)
18	Ala (21; Г)	Ser (-; Г)	45	Glu (5; A)	Asn (8; A)
19	Ala (23; Г)	Pro (29; Г)	46	Gly (3; A)	Phe (9; Г)
20	Asn (11; A)	Gly (18; A)	47	Phe (5; A)	Val (10; Г)
21	Ala ² (44; Г)	Ala ² (44; Г)	48	Asp (4; A)	Gly (5; A)
22	Ala (15; Г)	Asp (21; A)	49	Phe (3; A)	Cys (4; A)
23	Cys (12; A)	Arg (-; A)	50		Ser (5; A)
24	Gln (9; A)	Val (24; Г)	51		Asn (6; A)
25	Tyr (11; A)	Ile (23; Г)	52		Ser (4; A)
26	Tyr (10; A)	Ile (25; Г)	53		Thr (3; A)
27	Gln (8; A)	Asn (13; A)			
Положение в цепи РНКазы				1-49	53-105

* См. примечания к табл. 3.

Частичное решение проблемы неоднозначности соотношения аминокислотных остатков РНКазы в указанных выше позициях полипептидной цепи могло быть достигнуто при проведении секвенирования фрагмента белка, полученного при его расщеплении по связи Asn—Gly гидроксиламино. Неожиданным для нас экспериментальным фактом оказалось, что в нефракционированном гидролизате РНКазы Fl₁, полученном под действием гидроксиламина, автоматической деградации по Эдману подвергались две полипептидные цепи (см. табл. 4, рис. 5). Одна из них содержала в качестве N-концевого остатка Gly и являлась, таким образом, C-концевым продуктом гидролиза белка по связи Asn—Gly. Другая, с остатком Glu на N-конце, очевидно, представляла собой N-концевой полипептид молекулы белка. Это позволяло предположить, что под действием гидроксиламина происходило раскрытие пирролидонкарбонового цикла N-концевого остатка белка.

Для проверки этого предположения в качестве модельной системы был выбран пептид Glp-Val-Glu-Tyr, выделенный ранее при установлении первичной структуры аспаратамиотрансферазы [18]. В этом пептиде N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты не реагирует с дансилхлоридом. Однако обработка пептида гидроксиламино при 45° С в течение 12 ч с последующим дансильрованием продукта, его гидролизом 5,7 н. HCl и анализом дансиламино кислот (так называемой дансильной метод определения N-концевых остатков аминокислот) привело к обнаружению в качестве N-концевого остатка пептида остатка Glu с выходом, близким к количественному.

Механизм протекающей реакции в общем виде может быть представлен схемой



Образующееся на первой стадии реакции производное гидроксамовой кислоты (I) является относительно устойчивым соединением, способным вступать во взаимодействие с реагентами, используемыми при эдмановской деградации пептидов, в том числе с дансилхлоридом. В последнем случае солянокислого гидролиза соответствующее ди-Dns-производное (II) распадается до дансилглутаминовой кислоты (III).

Дополнительное доказательство наличия в РНКазе Fl₁ остатка пирроглютаминовой кислоты получено в экспериментах по деблокированию N-концевого пептида РНКазы под действием пирролидонкарбоксилпептидазы. Настоящий фермент — один из наиболее мягких агентов, отщепляющих остатки пирролидонкарбоновых кислот. Вместе с тем эффективность действия фермента существенно зависит от структуры субстрата, и в первую очередь от длины деблокируемого пептида [19]. Действительно, независимо от продолжительности инкубации (до 48 ч) даже при соотношении фермента к субстрату, равном 1 : 10, интактная (карбоксиметилированная) РНКазы Fl₁, по данным определения N-концевого аминокислотного остатка белка, устойчива к действию пирролидонкарбоксилпептидазы. Качественно иная картина наблюдается при обработке ферментом смешанного триптического-химотриптического гидролизата РНКазы, модифицированного с целью блокирования N-концевых аминогрупп пептидов, реализуемых при ферментативном протеолизе, флуорескаминном [20]. Анализ дансильным методом не выявляет N-концевых остатков аминокислот в приготовленном таким образом субстрате до его обработки пирролидонкарбоксилпептидазой. После инкубации с ферментом в качестве единственного N-концевого аминокислотного остатка в смеси обнаружен остаток Ala.

Таким образом, полипептидная цепь РНКазы Fl₁ действительно начинается с остатка пирроглютаминовой кислоты и регенерация N-концевой аминокислотной последовательности белка под действием гидроксилamina для эдмановской деградации не результат гидролиза какой-либо внутренней пептидной связи РНКазы, а следствие специфической дециклизации в белке соответствующей N-концевой лактамной группировки.

Исследование продуктов секвенирования двух образующихся при гидролизе РНКазы Fl₁ гидроксиламином полипептидов (табл. 4) позволило завершить расшифровку полной первичной структуры белка. Эти данные, с одной стороны, позволили получить отсутствующую ранее информацию об аминокислотной последовательности N-концевой части РНКазы (остатки 1—16, рис. 5) и сегментах полипептидной цепи РНКазы (остатки 31—42 и 90—101, рис. 5), а с другой — подтвердили выведенные ранее структуры пептидов.

РНКазы Fl₁ содержит 105 аминокислотных остатков с *M_r* 10 852, в том числе шесть остатков дикарбоновых кислот (4 Asp и 2 Glu) и три остатка Arg при наличии блокированной N-концевой аминогруппы, и является, следовательно, кислым белком, что согласуется с его аномальной электрофоретической подвижностью в полнакриламидном геле. Сравнение первичных структур РНКазы Fl₁ и РНКазы F₁ свидетельствует о высоком уровне структурной гомологии ферментов (рис. 5). Структуры двух белков различаются между собой в 15 позициях полипептидной цепи,

и выявленные аминокислотные замены не затрагивают участки каталитического центра РНКаз и области связывания субстратов [21, 22]. Так же как в РНКазе F_1 , в РНКазе F_{11} не обнаруживаются свободных сульфгидрильных групп. Идентичная локализация в аминокислотных последовательностях белков четырех остатков Cys позволяет предположить наличие в РНКазе F_{11} двух дисульфидных мостиков, связывающих остатки Cys⁵ с Cys¹⁰¹ и Cys²³ с Cys⁸², подобно тому, как это найдено в случае РНКазы F_1 [23]. Все вышесказанное не оставляет сомнения в общности генетического происхождения РНКаз рода *Fusarium* и их связи с другими представителями внеклеточных гуанилспецифичных РНКаз грибов различных таксономических групп.

Экспериментальная часть

Культура гриба *F. lateritium* 54228 получена из коллекции Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР. Вегетативный посевной материал выращивали 24 ч в колбах на качалках при 25° С на среде, содержащей 5% глюкозы, 1% пептона, 0,5% соевой муки, 0,05% $MgSO_4$, 0,01% $CaCl_2$ и 0,2% KNO_3 , pH 6,2 [15]. Глубинное выращивание культуры проводили на той же среде в течение 66 ч в режиме, использованном ранее для получения продуцента РНКазы Ar_1 [12]. Мицелий отделяли фильтрованием через четыре слоя капроновой ткани. Фильтрат центрифугировали 30 мин при 4000 об/мин и использовали в качестве источника РНКазы F_{11} . Очистку проводили при 20° С.

Выделение РНКазы F_{11} . Фильтрат культуральной жидкости доводили сульфатом аммония при перемешивании до 90% насыщения и выдерживали 2 сут при 4° С. Осадок отделяли центрифугированием при 4500 об/мин в течение 30 мин и суспендировали в 50 мМ трис-НСI-буфере, pH 7,7. Раствор фермента отделяли от нерастворимого осадка повторным центрифугированием в тех же условиях и диализовали против 50 мМ трис-НСI-буфера, pH 7,7.

Полученный диализат наносили на колонку (5 × 20 см) с ДЕАЕ-целлюлозой (DE-52, Serva, ФРГ), уравновешенной тем же буфером, и колонку промывали (1 л/ч) исходным буфером (~ 2,5 л) до значения A_{280} в элюате, равного 0,2. Сорбированные белки элюировали раствором NaCl (градиент концентрации 0—0,5 М, общий объем 1 л) в 50 мМ трис-НСI-буфера, pH 7,7. Скорость элюции 150 мл/ч. Фракции, содержащие РНКазу F_{11} , объединяли и диализовали против дистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой до pH 4,2.

Диализат наносили на колонку (2,5 × 12 см) с СМ-целлюлозой (СМ-52, Serva, ФРГ), уравновешенной 20 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 4,2. Колонку промывали (150 мл/ч) тем же раствором для удаления несорбированных белков и фермент элюировали со скоростью 50 мл/ч 400 мл натрий-ацетатного буфера, pH 4,2 (линейный градиент концентрации 20—500 мМ).

Фракции белка с одинаковой удельной активностью объединяли и концентрировали ультрафильтрацией через мембрану UM-5 до 4 мл. Раствор РНКазы F_{11} обессоливали на колонке с сефадексом G-25f и высушивали лиофильно.

Активность РНКазы F_{11} по отношению к РНК определяли модифицированным методом Анфинсена [15] при pH 8,0 в 0,1 М трис-НСI-буфере, принимая за единицу активности количество фермента, вызывающее увеличение поглощения гидролизующей смеси при A_{260} на 1 ОЕ. Концентрацию белка рассчитывали, полагая $E_{260}^{0,1\%} = 1$.

Гидролиз нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и полирибонуклеотидов (препараты любезно предоставлены А. Л. Бочаровым, ИМБ АН СССР) осуществляли инкубацией $1,5 \cdot 10^{-3}$ М субстратов с $1,2 \cdot 10^{-5}$ М РНКазой F_{11} при комнатной температуре в 50 мМ трис-ацетатном буфере, pH 7,0. Продукты ферментативного расщепления анализировали методом ТСХ. Аликваты гидролизующей смеси (15—30 мкл) наносили в различные интервалы времени на пластинки Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР) и хроматографировали в системе изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2).

Аналитический электрофорез проводили на пластинках 12,5% полиакриламидного геля толщиной 1 мм в присутствии додецилсульфата натрия [24]. Белки деватурировали при кипячении в течение 10 мин с 2% додецилсульфатом натрия и 5% β-меркаптоэтанолом.

Автоматическую деградацию по Эдману осуществляли на секвенаторе Beckman 890С (США) в присутствии 3 мг полибрена и 100 нмоль глицилглицина, предварительно подвергнутых пяти полным циклам секвенирования [9, 12]. Продукты деградации после 10-мин конверсии в 1 н. HCl при 80° С анализировали методами ТСХ, ГЖХ и аминокислотного анализа [6].

Триптический гидролиз S-карбоксиметилированной РНКазы F_{11} проводили после 10 циклов секвенирования белка, в ходе которых не было обнаружено продуктов эдмановской деградации. Процесс секвенирования на этой стадии прерывали, белок гидролизовали 8 ч в реакционной ячейке секвенатора трипсином в 0,1 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, pH 8,5, при 37° С и соотношении ферментов к субстрату ~ 1 : 50. Высвободивший гидролизат подвергали дальнейшему секвенированию.

Гидролиз РНКазы F_{11} стафилококковой протеиназой проводили 4 ч в том же буфере при 37° С и соотношении фермент — субстрат 1 : 30.

Кинетику протеолиза *S*-карбоксиметил-РНКазы F_1 карбоксипептидазой Y (50 мМ *N*-этилморфолин-ацетат, рН 7,5; 37° С, $E/S = 1 : 100$) прослеживали, анализируя содержание отщепляемых аминокислот количественным дансильным методом после разделения дансильаминокислот ТСХ на полиамидных пластинках и сканирования с использованием спектрофлуориметра РМQ-II (Opton, ФРГ) [25]. В качестве внутреннего стандарта использовали α -аминомасляную кислоту.

Расщепление *S*-карбоксиметил-РНКазы F_1 гидроксиламиноом проводили по методике Борнштейна [17]. Белок растворяли при концентрации 5 мг/мл в 0,2 М $KHCO_3$, содержащем 2 М солянокислый гидроксиламин и 7 М гуанидингидрохлорид, рН 9,0. Смесь инкубировали 4 ч при 45° С и обессоливали на колонке (20 × 1 см) с сефадексом G-15. Аналогичным образом осуществляли обработку в течение 12 ч гидроксиламиноом пептида G1р-Val-Glu-Tyr, выделенного ранее при изучении аминокислотной последовательности аспаргатаминотрансферазы из сердца кур [18].

Смешанный ферментативный гидролиз РНКазы F_1 проводили при 37° С в 0,1 М *N*-этилморфолин-ацетатном буфере, рН 8,5, добавляя к раствору белка (5 мг/мл) вначале трипсины ($E/S = 1 : 50$), а затем, через 2 ч, химотрипсин при том же соотношении фермента к субстрату. Протеолиз продолжали 16 ч. Гидролизат модифицировали флуорескаминном [20] и высушивали лиофильно.

Обработку интактной *S*-карбоксиметил-РНКазы F_1 ($E/S = 1 : 10$), а также ее триптически-химотриптического гидролизата ($E/S = 1 : 30$) пироглутамат-аминопептидазой (Boehringer, ФРГ) проводили 6 ч при 20° С в 20 мМ *N*-этилморфолин-ацетатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ β -меркаптоэтанол и 1 мМ EDTA [19].

Аминокислотный состав белка определяли после его 24-ч гидролиза при 105° С 5,7 н. HCl на автоматическом анализаторе LC-5001 (ФРГ). Подробные методики других экспериментов описаны в представленных публикациях.

ЛИТЕРАТУРА

- Hartley R. W., Barker E. A. // Nature New Biol. 1972. V. 235. № 53. P. 15—16.
- Aphanasenko G. A., Dudkin S. M., Kaminir L. V., Leshchinskaya I. B., Severin E. S. // FEBS Lett. 1979. V. 97. № 1. P. 77—80.
- Yoshida N., Sasaki A., Rashid M. A., Otsuka H. // FEBS Lett. 1976. V. 64. № 1. P. 122—125.
- Шляпников С. В., Ботт В., Куликов В. А., Дементьев А. А., Зелинка Я. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 760—772.
- Takahashi R. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 3. P. 815—817.
- Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 334—345.
- Bezborodova S. I., Khodova O. M., Stepanov V. M. // FEBS Lett. 1983. V. 159. № 12. P. 256—258.
- Watanabe H., Ohgi K., Irie M. // J. Biochem. 1982. V. 91. № 5. P. 1495—1509.
- Шляпников С. В., Безбородова С. И., Куликов В. А., Яковлев Г. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 172—184.
- Hirabayashi J., Yoshida H. // Biochem. Internat. 1983. V. 7. № 2. P. 255—262.
- Безбородова С. И., Василева-Тонкова Е. С., Поляков К. М., Шляпников С. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 453—466.
- Безбородова С. И., Ермекбаева Л. А., Шляпников С. В., Поляков К. М., Безбородова А. М. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 6. С. 911—921.
- Безбородова С. И., Маржаускайте Р. Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 1972. Т. 8. № 1. С. 107—111.
- Безбородова С. И., Безбородова А. М. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979. С. 92—145.
- Безбородова С. И., Бородаева Л. И., Цанкова Л. Н. // Микробиология. 1968. Т. 37. № 2. С. 10—14.
- Houtard J., Drapeau G. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 247. P. 3506—3509.
- Bornstein P. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 12. P. 2408—2420.
- Shlyapnikov S. Y., Myasnikov A. N., Severin E. S., Myagkova M. A., Torchinsky Y. P., Braunstein A. E. // FEBS Lett. 1979. V. 106. № 2. P. 385—388.
- Мясников А. Н., Шляпников С. В. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 4. С. 529—541.
- Mendez E. // Anal. Biochem. 1982. V. 127. № 1. P. 55—60.
- Поляков К. М., Строкопитов Б. В., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн В. К. // Кристаллография. 1987. Т. 32. № 4. С. 918—926.
- Sugio S., Amisaki T., Ohishi H., Tomita K., Heinemann U., Saenger W. // FEBS Lett. 1985. V. 181. № 1. P. 129—132.
- Yoshida H., Naito S. // Anal. Biochem. 1986. V. 159. № 2. P. 273—279.
- Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
- Афанасенко Г. А., Исанов В. Я., Шляпников С. В., Каминир Л. В., Северин Е. С. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 12. С. 2178—2185.

Поступила в редакцию

25.II.1987

После доработки

3.III.1988

RIBONUCLEASE F_I *FUSARIUM LATERITIUM*. PURIFICATION,
SUBSTRATE SPECIFICITY AND AMINO SEQUENCE

BEZBORODOVA S. I., CHEPURNOVA N. K.*, SHLYAPNIKOV S. V.*

*All-Union Institute of Genetics and Selection
of Industrial Microorganisms; *Institute
of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Extracellular RNase F_I has been purified from the culture filtrate of *Fusarium lateritium*. The enzyme has been obtained in the electrophoretically homogenous state with the yield about 90% and 300 fdd degree of purification. RNase F_I is a guanyl specific enzyme (EC 3.1.27.3) with the specific activity on RNA 1420 units/mg of protein. The total primary structure of the RNase has been determined by the automated Edman degradation of two non-fractionated peptide hydrolysates produced by trypsin and *Staphylococcus aureus* protease and of the hydroxylamine cleavage products of the protein. It was shown that hydroxylamine converts the RNase F_I N-terminal residue, pyroglutamic acid, into the hydroxyamic acid derivative sensitive to Edman degradation. RNase F_I consists of 105 amino acid residues (M_r 10 852) and is a structural homologue of the *Fus. moniliforme* RNase F₁, differing from the latter by 15 amino acid substitutions outside the enzyme active site.