



УДК 577.112.5:591.145.2

## АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НЕЙРОТОКСИНА I ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

Зыкова Т. А., Козловская Э. П.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО Академии наук СССР, Владивосток

Установлена аминокислотная последовательность нейротоксина I из морской актинии *Radianthus macrodactylus*, состоящего из 48 аминокислотных остатков, в том числе шести остатков цистеина. Для установления структуры исследовались пептиды, полученные в результате гидролиза токсина трипсином и химотрипсином.

Анемонотоксины модифицируют свойства натриевых каналов электровозбудимых мембран, участвующих в генерации потенциала действия в нерве, сердце, скелетных мышцах [1, 2]. Поэтому они являются прекрасным инструментом исследования молекулярной организации и механизмов функционирования ионных каналов.

Из морской актинии *Radianthus macrodactylus* выделены пять нейротоксинов (RTX-I—RTX-V) [3], для четырех из них установлена полная аминокислотная последовательность [4—6]. Показано, что RTX-токсины образуют новый структурный класс анемонотоксинов [3, 6].

Настоящая работа посвящена установлению аминокислотной последовательности пятого токсина *Radianthus* — RTX-I ( $LD_{50}=3600$  мкг/кг). Токсин выделен по методу [3], и его гомогенность доказана анализом N-концевой аминокислотной последовательности. Аминокислотный состав токсина представлен в табл. 1. N-Концевой аминокислотой является аланин, C-концевой — лизин. Дисульфидные связи RTX-I восстанавливали β-меркаптоэтанолом с последующей модификацией сульфгидрильных групп моноиодуксусной кислотой. Карбоксиметилированный токсин (СМ-токсин) обессоливали на полихrome I.

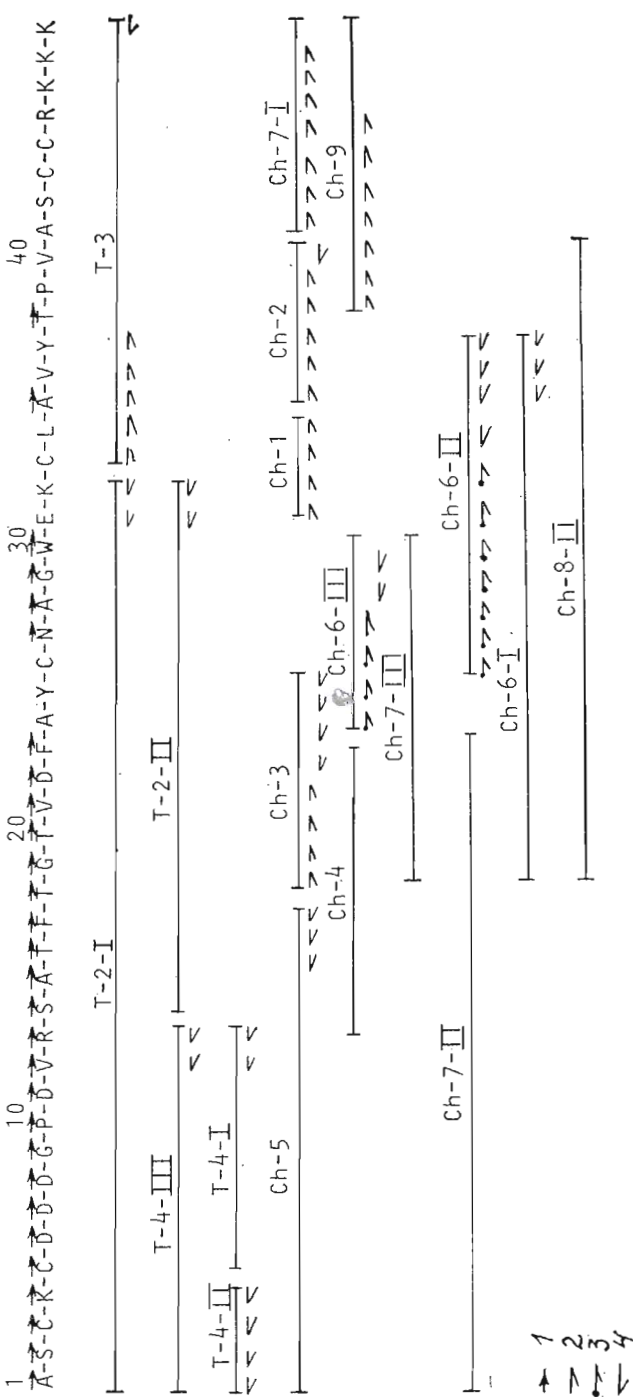
Таблица 1

Аминокислотный состав СМ-RTX-I и пептидов, полученных при гидролизе трипсином (Т)

Аминокислота	RTX-I	Т-3	Т-4-I	Т-4-II	Т-4-III	Т-2-I	Т-2-II
Cys (См)	5,7(6)	3,2(3)	0,9(1)	0,9(1)	2,1(2)	3,1(3)	1,2(1)
Asx	5,9(6)		3,8(4)		4,0(4)	5,8(6)	1,7(2)
Thr	4,2(4)	1,2(1)				2,8(3)	3,1(3)
Ser	3,1(3)	1,0(1)		1,1(1)	1,1(1)	2,1(2)	0,8(1)
Glx	0,8(1)					1,1(1)	1,2(1)
Pro	2,2(2)	1,2(1)	1,0(1)		1,2(1)	1,2(1)	
Gly	3,4(3)		1,2(1)		1,3(1)	3,2(3)	2,2(2)
Ala	5,7(6)	2,2(2)		1,2(1)	0,9(1)	3,8(4)	3,1(3)
Val	4,2(4)	2,2(2)	1,2(1)		1,2(1)	1,7(2)	0,9(1)
Phe	2,2(2)					2,1(2)	2,0(2)
Leu	0,9(1)	1,1(1)					
Tyr	2,3(2)	1,2(1)				1,2(1)	1,2(1)
Lys	5,2(5)	2,7(3)		1,2(1)	0,9(1)	2,0(2)	0,9(1)
Arg	2,1(2)	1,2(1)	1,0(1)		1,1(1)	1,2(1)	
Trp*	1					+	+
N-Концевая	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Ser
Количество остатков	48	16	9	4	13	32	19

\* Триптофан в RTX-I определяли методом УФ-спектроскопии, в остальных случаях — качественной реакцией по Эрлиху.

Схема



Аминокислотная последовательность нейротоксина I, определенная автоматическим жидкофазным методом Эдмана (1), ручным методом Эдмана в дансильном варианте (2) и с идентификацией фенилтиогидантоиновых производных (3), карбоксипептидазой Y (4). Показаны пептиды триптического (T) и химотриптического (Ch) гидролизом

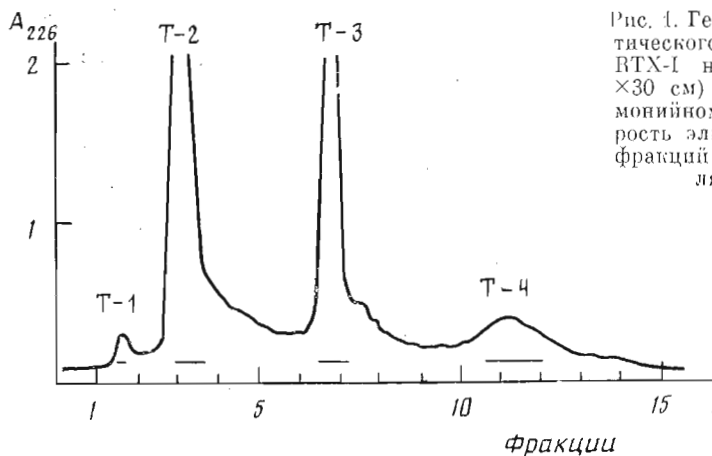


Рис. 1. Гель-фильтрация триптического гидролизата СМ-RTX-I на биоэле Р-4 (0,5×30 см) в 0,05 М ацетат-аммонийном буфере, рН 7,6. Скорость элюции 12 мл/ч. Объем фракций 5 мл. Отмечены выделяемые фракции

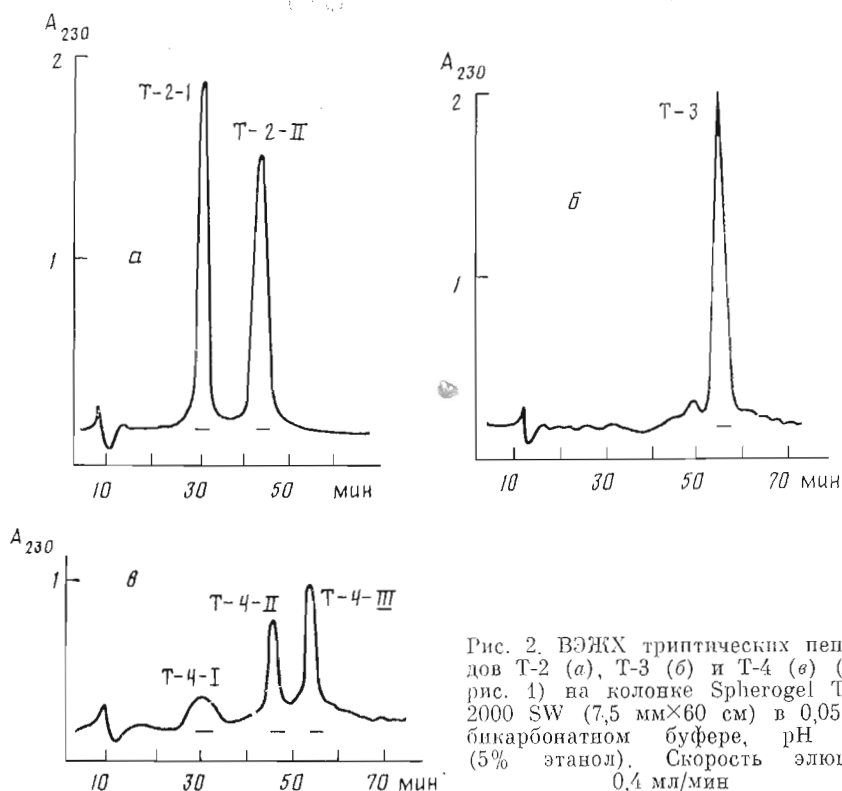


Рис. 2. ВЭЖХ триптических пептидов Т-2 (а), Т-3 (б) и Т-4 (в) (см. рис. 1) на колонке Spherogel TSK 2000 SW (7,5 мм×60 см) в 0,05 М бикарбонатном буфере, рН 7,6 (5% этанол). Скорость элюции 0,4 мл/мин

N-Концевая аминокислотная последовательность установлена автоматическим жидкофазным методом Эдмана. В результате 40 циклов автоматической деградации определены последовательности 23 N-концевых аминокислот и остатки в положениях 27, 28, 29, 30, 35 и 38 (схема).

По данным аминокислотного анализа, белок содержит два остатка аргинина и пять остатков лизина. При гель-фильтрации продуктов расщепления карбоксиметилированного токсина (СМ-RTX-I) трипсином на биоэле Р-4 было получено четыре пептидных фрагмента (рис. 1). Фракция Т-1 представляет собой недогидролизированный СМ-RTX-I. Фракции Т-2, Т-3, Т-4 были хроматографированы ВЭЖХ на колонке Spherogel TSK 2000 SW (рис. 2).

Для выделенных триптических пептидов с помощью карбоксипептидазы Y была определена частичная С-концевая последовательность, для Т-3—частичная N-концевая последовательность. Положение Т-пептидов в полипептидной цепи молекулы установлено на основании данных N-конце-

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе CM-RTX-I химотрипсином (Ch)

Аминокислота	Ch-1	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-5
Cys (Cm)	0,9(1)				1,7(2)
Asx			0,9(1)	1,1(1)	3,7(4)
Thr		1,1(1)	2,2(2)	2,7(3)	1,1(1)
Ser				1,1(1)	2,2(2)
Glx	1,1(1)				
Pro		0,9(1)			1,2(1)
Gly			1,3(1)	1,2(1)	1,1(1)
Ala		1,3(1)	1,1(1)	1,0(1)	2,1(2)
Val		2,1(2)	1,2(1)	0,9(1)	1,1(1)
Leu	0,8(1)				
Tyr		1,1(1)	0,9(1)		
Phe			1,2(1)	2,1(2)	1,2(1)
Lys	1,2(1)				1,1(1)
Arg				0,9(1)	1,0(1)
Trp					
N-Концевая	Glu	Ala	Thr	Arg	Ala
Количество остатков	4	6	8	11	17

Аминокислота	Ch-9	Ch-6-I	Ch-6-II	Ch-6-III	Ch-7-I	Ch-7-II	Ch-7-III	Ch-8-II
Cys (Cm)	2,2(2)	2,1(2)	2,2(2)	1,2(1)	2,2(2)	2,1(2)	0,9(1)	2,1(2)
Asx		2,2(2)	1,2(1)	0,9(1)		4,6(5)	2,1(2)	1,8(2)
Thr	1,2(1)	2,1(2)				2,7(3)	2,1(2)	2,8(3)
Ser	1,1(1)				1,2(1)	2,2(2)		
Glx		1,2(1)	0,9(1)					1,2(1)
Pro	0,9(1)					0,9(1)		1,1(1)
Gly		2,1(2)	1,2(1)	1,1(1)		2,1(2)	2,2(2)	2,1(2)
Ala	1,2(1)	2,7(3)	1,7(2)	2,2(2)	0,8(1)	2,2(2)	2,1(2)	3,2(3)
Val	0,9(1)	2,2(2)	0,9(1)			1,8(2)	0,9(1)	2,8(3)
Leu		0,9(1)	1,0(1)					1,1(1)
Tyr		2,1(2)	1,2(1)	1,2(1)			0,9(1)	2,2(2)
Phe		0,9(1)				2,2(2)	1,2(1)	0,9(1)
Lys	3,1(3)	1,1(1)	0,9(1)		3,2(3)	0,9(1)		1,2(1)
Arg	1,2(1)				1,1(1)	1,2(1)		
Trp*		+	+	+			+	+
N-Концевая	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr
Количество остатков	11	20	12	7	8	23	13	23

\* Триптофан определяли качественной реакцией по Эрлиху.

вого анализа, аминокислотного состава (табл. 1) и N-концевой аминокислотной последовательности (схема).

Информация о структуре триптических пептидов и аминокислотного состава RTX-I позволяла предполагать, что при гидролизе токсина химотрипсином будут получены достаточно короткие пептидные фрагменты, удобные для определения аминокислотной последовательности ручным методом Эдмана и карбоксипептидазой Y. Продукты химотриптического гидролиза были разделены ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (рис. 3). Из полученных фракций отбирали пробы для определения N-концевого аминокислотного остатка. Для гомогенных по N-концу пептидов (Ch-1, Ch-2, Ch-3, Ch-5 и Ch-9) после анализа аминокислотного состава была определе-

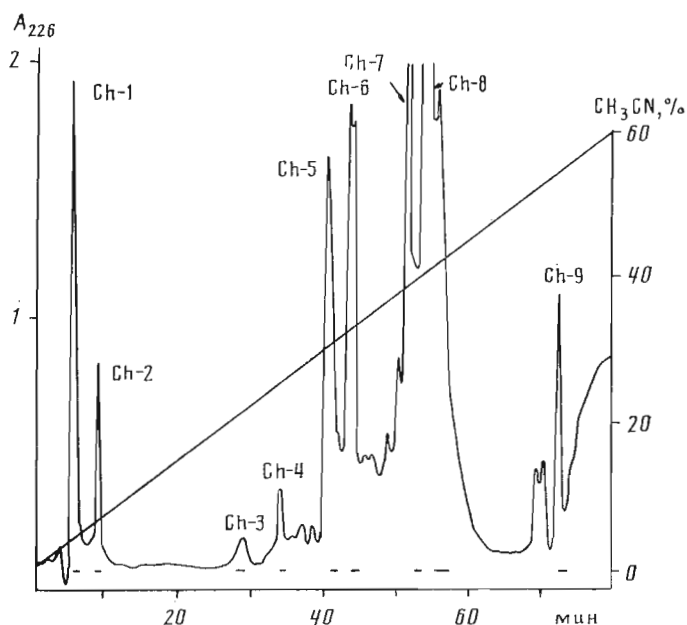


Рис. 3. ВЭЖХ пептидов химотриптического гидролиза CM-RTX-I на колонке Ultrasphere ODS (4,6×250 мм) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 80 мин). Скорость элюции 1 мл/мин. Отмечены выделяемые фракции

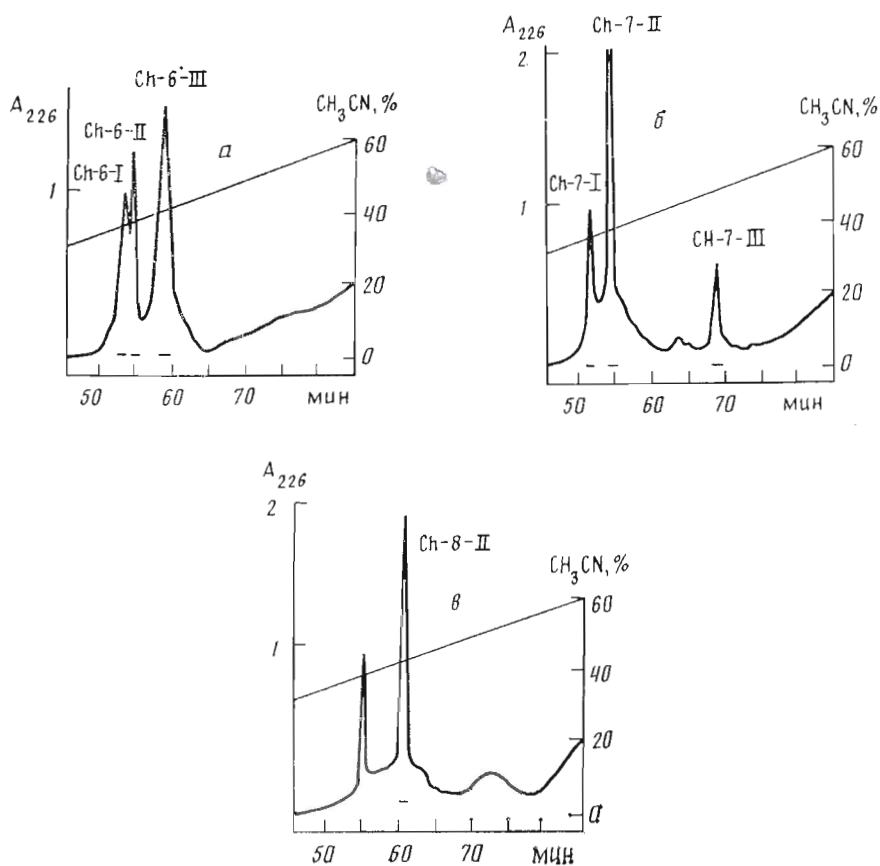


Рис. 4. ВЭЖХ химотриптических пептидов Ch-6 (а), Ch-7 (б), Ch-8 (в) на колонке Zorbax ODS (4,6×250 мм) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 80 мин). Скорость элюции 1 мл/мин

на частичная или полная аминокислотная последовательность (схема). Пептид Ch-1 перекрыл триптические пептиды T-2-I и T-3.

После ВЭЖХ неомогенных пептидов Ch-6, Ch-7 и Ch-8 на колонке Zorbax ODS (рис. 4) фракции анализировали на N-конец и аминокислотный состав (табл. 2). Структура пептидов, необходимая для получения перекрытий, была определена частично или полностью (см. схему).

Таким образом, исследование структуры пептидов, полученных в результате расщепления токсина I трипсином и химотрипсином, позволило установить его полную аминокислотную последовательность (схема). Полипептидная цепь нейротоксина I состоит из 48 аминокислотных остатков, в состав которых входят шесть остатков цистеина. C-Концевая последовательность -Lys-Lys-Lys выведена на основании данных аминокислотного состава RTX-I, пептидов T-3, Ch-9 и Ch-7-I.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин и химотрипсин (Worthington, США), реактивы для автоматического метода Эдмана (Beckman, США),  $\beta$ -меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), полихром I (г. Олайне, СССР), 5-диметиламино-нафталин-1-сульфонилхлорид (Serva, ФРГ), карбоксипептидазу Y (Sigma, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Методы определения аминокислотного состава, аминокислотной последовательности автоматическим жидкофазным методом, ручным методом в дансилном варианте и с идентификацией фенилтиогидантоиновых производных, ферментативного гидролиза белков, содержания ароматических аминокислот описаны ранее [4, 6].

*Высокоэффективная жидкостная хроматография.* Триптические пептиды SM-RTX-I хроматографировали на колонке Spherogel TSK 2000 SW (7,5 мм×60 см) в 0,05 М бикарбонатном буфере, pH 7,6 (5% этанол). Скорость элюции 0,4 мл/мин.

Химотриптические пептиды SM-RTX-I разделяли на колонке Ultra-sphere ODS (4,6×250 мм) или Zorbax ODS (4,6×250 мм) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила (0–60%) за 80 мин. Скорость элюции 1 мл/мин.

Авторы выражают глубокую благодарность за техническую помощь при установлении аминокислотной последовательности автоматическим методом А. С. Корнееву (Институт биоорганической химии АН УзССР, Ташкент).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alsen C. // Fed. Proc. 1983. V. 42. № 1. P. 101–108.
2. Erxleben C., Rathmayer W. // Toxicon. 1984. V. 22. № 3. P. 387–399.
3. Зыкова Т. А. Исследование первичной структуры биологически активных пептидов актинии *Radianthus macrodactylus*: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток: ТИХОХ, 1986.
4. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 302–310.
5. Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 878–882.
6. Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1489–1494.

Поступила в редакцию  
15.II.1989

### AMINO ACID SEQUENCE OF NEUROTOXIN I FROM THE SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

ЗЫКОВА Т. А., КОЗЛОВСКАЯ Е. Р.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch,  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Amino acid sequence of neurotoxin I isolated from the anemone *Radianthus macrodactylus*, and consisted of 48 amino acid residues, including six cysteines, was determined by analysis of products of its trypsin and chymotrypsin digestion.