



УДК 577.112.5

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НЕКОТОРЫХ
ПЕПТИДОВ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ
ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА*Заргарова Т. А., Ковалева Г. К., Фаворова О. О.,
Левина Н. Б.*, Тележинская И. Н.***Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Академии наук
СССР, Москва;***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук
СССР, Москва*

Модифицированный метод выделения Тгр-тРНК-синтетазы из поджелудочной железы быка позволил получить белок $\geq 99\%$ чистоты по данным электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Проведен гидролиз высокоочищенной Тгр-тРНК-синтетазы кластрипанном; гидролизат разделен анионообменной хроматографией умеренного давления с последующей рехроматографией полученных фракций методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. С помощью автоматической деградации по методу Эдмана установлены полные аминокислотные последовательности шести индивидуальных пептидов, из которых один оказался С-концевым. Обнаружен также пептид, содержащий аминокислоты, кодированные с наименьшей вырожденностью.

Аминоацил-тРНК-синтетазы играют ключевую роль в биосинтезе белков, катализируя высокоспецифическую реакцию присоединения аминокислоты к соответствующей тРНК с использованием энергии АТФ. Ферменты этой группы были открыты в середине 50-х годов; хотя с тех пор достигнуты значительные успехи в изучении их структуры и функции, первичная структура установлена только для немногим более 20 аминокислот-тРНК-синтетаз (см. [1]). Все эти ферменты выделены либо из прокариот, либо из одноклеточных эукариотических организмов (*S. cerevisiae*).

Первые, крайне немногочисленные данные о первичной структуре аминокислот-тРНК-синтетаз млекопитающих появились только в последние годы [2, 3], что объясняется трудностью клонирования соответствующих генов. Показательно в этом отношении, что клон, содержащий ген глутаминил-тРНК-синтетазы человека, был выделен из кДНК библиотеки в λ gt11 при иммуноскрининге с помощью антител к ДНК-полимеразе [2].

Триптофанил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2), состоящая из двух идентичных или близких к идентичности субъединиц с $M \sim 60$ кДа, в настоящее время — одна из наиболее изученных аминокислот-тРНК-синтетаз млекопитающих [4–7]. Задача данной работы заключалась в выявлении в первичной структуре Тгр-тРНК-синтетазы аминокислотной последовательности, пригодной для синтеза олигонуклеотидных зондов с целью клонирования гена этого фермента. Структура других пептидов, секвенированных в ходе данной работы, понадобится для проверки правильности полной аминокислотной последовательности Тгр-тРНК-синтетазы, полученной на основании нуклеотидной последовательности гена.

Описанная ранее методика очистки Тгр-тРНК-синтетазы [5] позволяет получать фермент $\sim 95\%$ чистоты. Этого в ряде случаев недостаточно для структурных исследований. На заключительном этапе выделения Тгр-тРНК-синтетазы мы отказались от стадии гель-хроматографии на сефадексе G-200. Вместо этого препарат из суспензии, полученной при высаливании 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и перенесенной в колонку с Toyopearl HW-55, элюировали понижающимся градиентом концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (рис. 1а). Объединенный пик подвергали осаждению при pH 5,0, обеспечивающему,

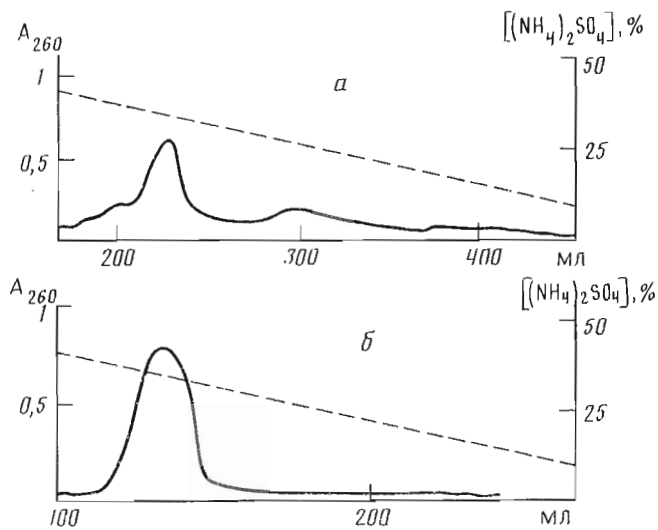


Рис. 1. Получение высокоочищенной Трп-тРНК-синтетазы на колонке с Toyopearl HW-55. Хроматография (а) и рехроматография (б) в обратном градиенте концентраций $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (см. «Экспер. часть»)

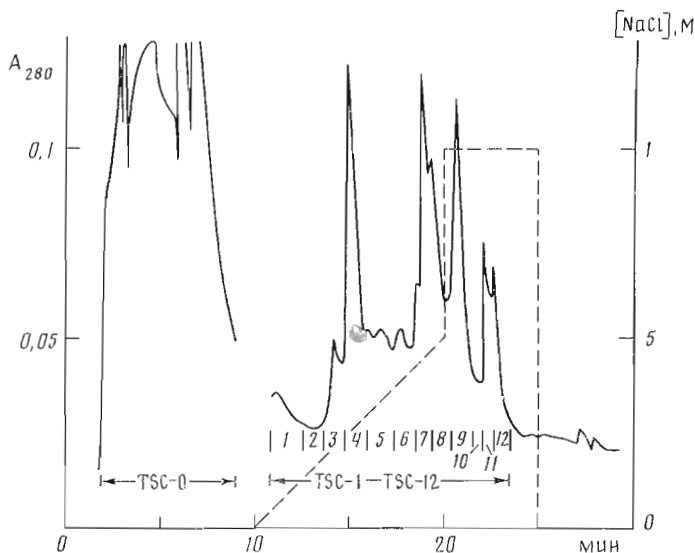


Рис. 2. Разделение кластеризованного гидролизата Трп-тРНК-синтетазы на хроматографе умеренного давления FPLC-System; колонка Mono Q HR 5/5; скорость потока 1 мл/мин. Элюент: 20 mM трис-НСl, рН 7,6+градиент концентраций NaCl

по нашим данным, полное освобождение от примесей лейцинаминопептидазы, не удаляемой другими использованными методами. Трп-тРНК-синтетазу осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и проводили рехроматографию на Toyopearl HW-55 (рис. 1б). Выделенный белок при электрофорезе в ПААГ имел чистоту $>99\%$.

Ранее было показано, что N-концевой аминокислотный остаток Трп-тРНК-синтетазы блокирован [8]. Аминокислотный состав этого белка, определенный нами и рассчитанный на M 120 кДа, практически не отличался от такового, рассчитанного на M 108 кДа [8]. Различия наблюдались только в содержании остатков пролина в белке: по нашим данным, молекула фермента содержит 82 остатка Pro, что в 1,5 раза превышает значение, приведенное ранее [8].

Наличие в составе Трп-тРНК-синтетазы большого количества остатков аргинина (54, по нашим данным) определило проведение протеолиза белка

**Аминокислотная последовательность некоторых пептидов, полученных
в результате гидролиза Тгр-тРНК-синтетазы клострипаином**

Пептид	Аминокислотная последовательность *
TSC-0-14	Phe-Gly-Ser-Ser-Lys-Ile-Asp-Lys-Glu-Leu-Val-Asn-Arg
TSC-0-15	Lys-Leu-Ser-Tyr-Asp-Phe-Gln
TSC-0-19	Lys-Glu-Val-Asp-Met-Glu-Ile-Val-Lys-Glu-Phe-Met-Pro-Arg-Arg
TSC-0-20	Pro-Ala-Leu-Leu-His-Ser-Thr-Phe-Phe-Pro-Ala-Leu-Gln-Gly-Ala-Gln- Thr-Lys
TSC-0-22	Ile-Ser-Phe-Pro-Ala-Ile-Asn-Gln-Phe-Ala-Ala-Pro-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile- Arg
TSC-0-23	Asp-Tyr-Thr-Ser-Gly-Ala-Met-Leu-Thr-Gly-Glu-Leu-Lys-Lys-Glu-Leu- Ile-Glu-Val-Gln-Pro-Leu-Ile-Ala-Glu-His-Glu-Ser-Arg

* Подтверждена аминокислотным анализом.

с помощью клострипаина, преимущественно расщепляющего белковые молекулы по остаткам аргинина.

Клострипаиновый гидролизат депатурированной Тгр-тРНК-синтетазы подвергали предварительному фракционированию на колонке Mono Q HR 5/5 (рис. 2). Каждую из полученных фракций (TSC-0 — TSC-12) далее разделяли методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой. На рис. 3 приведен профиль разделения смеси нейтральных и положительно заряженных пептидов фракции TSC-0, объединяющей большую часть пептидов клострипаинового гидролизата.

Структура некоторых пептидов фракции TSC-0, содержащих аминокислоты, кодируемые с наименьшей вырожденностью, была определена при секвенировании на газофазном секвенаторе 470 А (таблица). Из шести секвенированных пептидов пептид TSC-0-19 характеризуется наименьшей вырожденностью генетического кода. Наличие в его составе двух остатков метионина — аминокислоты, кодируемой единственным кодоном AUG, и семи аминокислотных остатков, кодируемых только двумя кодонами-синонимами, делает выбранный пептид пригодным для синтеза олигонуклеотидных зондов.

Пептид TSC-0-15, оканчивающийся остатком глутамина, а не остатками аргинина или лизина, как другие клострипаиновые пептиды, по всей вероятности, расположен в С-концевой части белка. В работе [8] отщеплением С-концевых аминокислот этого фермента карбоксипептидазой А был выявлен участок структуры того же аминокислотного состава, что и TSC-0-15, однако несколько иной аминокислотной последовательности. Исходя из динамики отщепления аминокислот, авторы предположили такую С-концевую последовательность белка: (Asp, Ser, Tyr)-Leu-Phe-Gln. Скорее всего, авторам работы [8] следовало отнести остаток лейцина к аминокислотам, последовательность которых не установлена (приведены в скобках). В пользу этого, вероятно, свидетельствуют и неоднозначные результаты, полученные при селективном мечении белка тритием по методу [9].

Один из пептидов с установленной аминокислотной последовательностью, TSC-0-22, по данным иммуноферментного анализа, взаимодействовал с моноклональными антителами к нативной Тгр-тРНК-синтетазе, обозначенными как Ам 1 [10], что указывает на наличие в структуре этого пептида полной или частичной антигенной детерминанты для данных антител. Этому вопросу будет посвящено отдельное исследование.

Авторы глубоко благодарны А. А.-Г. Заргарову за помощь в экспериментах по разделению пептидов и Л. Л. Киселеву за неизменный интерес к этой работе.

Экспериментальная часть

В работе использовали Biogel P2 (Bio-Rad, США), Toyopearl HW-55 (Toyo Soda, Япония), гуанидингидрохлорид (Merck, ФРГ), соляную кислоту (Merck, ФРГ), сульфат аммония и этиловый спирт (ос. ч.), клострипаин (Worthington, США), ацетонитрил (артикул 29), трифторуксусную

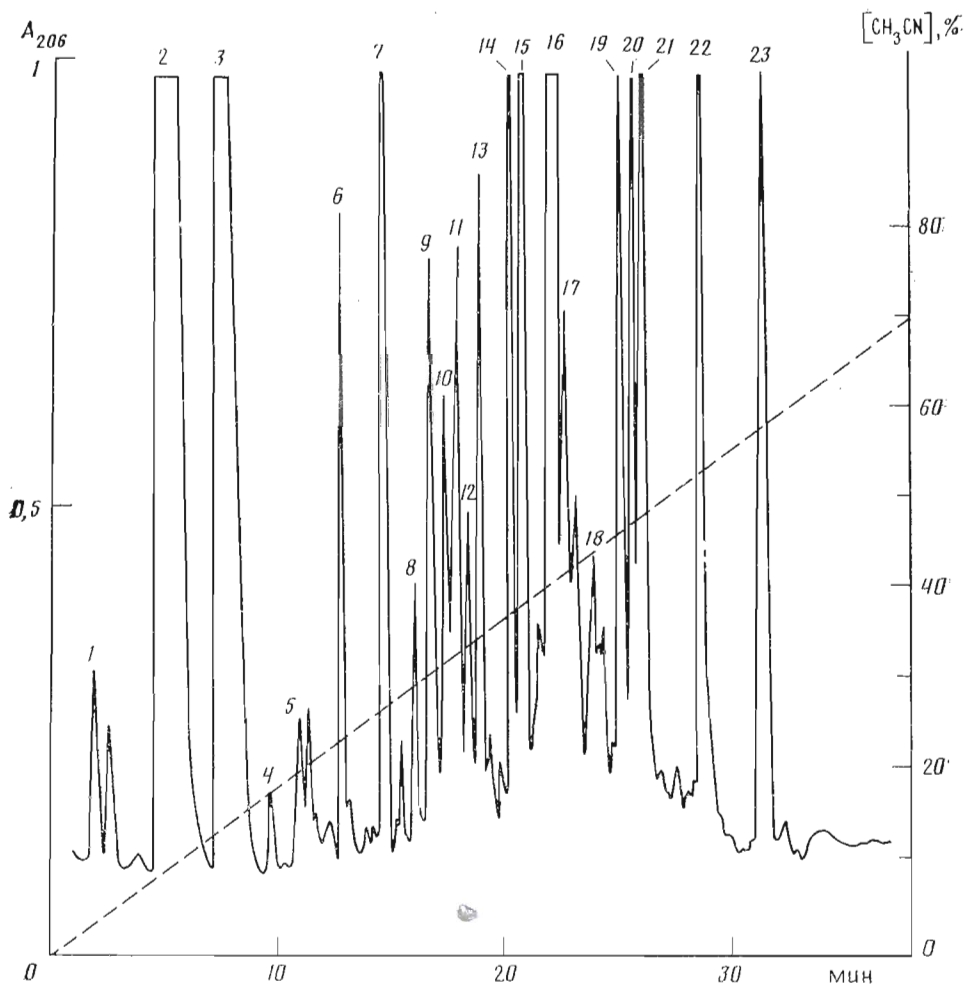


Рис. 3. Хроматография фракции TSC-0 методом ВЭЖХ на колонке Nucleosil 5C18 в градиенте концентрации ацетонитрила в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Скорость потока 0,8 мл/мин

кислоту, свежеперегнанную над окисью хрома, дитиотреит, кумасси G-250 (Sigma, США).

Электрофорез *Tgr-tPHK-сингетазы* проводили в градиентном (7–22%) ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [11]. Гель окрашивали 0,25% кумасси G-250 в 7% CH_3COOH .

Выделение Tgr-tPHK-сингетазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота проводили как описано в [4], исключая стадию гель-хроматографии. Фракцию белка, полученную после элюции с DEAE-целлюлозы, высаливали на холоду $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 60% насыщения. Осадок отделяли центрифугированием и суспендировали в 3 мл 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Суспензию переносили в колонку (1,5×13 см) поливинилового сорбента Toyopearl HW-55, уравновешенного 20 мМ буфером трис- HCl (pH 7,5), содержащим $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% насыщения, и проводили хроматографию, используя линейный градиент концентраций $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 60 до 10% насыщения в том же буфере (объем градиента 456 мл, скорость элюции 22 мл/ч). Основную белковую фракцию (215–240 мл, см. рис. 1, а) высаливали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, растворяли в 20 мМ трис- HCl (pH 7,5) и подвергали кислотному переосаждению [4]. В освобождении от примесей лейцинаминолепτιдазы убеждались, определяя ее активность в сравнении со стандартным препаратом лейцинаминолепτιдазы [12].

Полученный осадок суспендировали в 3 мл того же буфера, содержащего $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% насыщения, и проводили рехроматографию на колонке

(1,5×9 см) с Toyocarl HW-55, как описано выше (объем градиента 285 мл, скорость элюции 70 мл/ч). Белок высаливали на холоду, доводя содержание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 60% насыщения. Отделенный осадок растворяли в 10 мМ трис-НСl (рН 7,5) и белок осадили на холоду абсолютным этанолом (конечная концентрация 80%). Отделенный центрифугированием осадок тщательно промывали 80% этанолом.

Гидролиз Trp-гРНК-синтетазы кластрипаином и предварительное разделение пептидов. Осадок белка растворяли в 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), содержащем 1 мМ дитиотреит и 1 мМ CaCl_2 , при добавлении гуанидингидрохлорида (конечная концентрация 2 М). Полученный белковый раствор освобождали от гуанидингидрохлорида на колонке фирмы Whatman (1×31 см) с Biogel P2, уравновешенной тем же буфером. Гидролиз кластрипаином проводили в течение 12 ч при 20° С с перемешиванием (соотношение белок — кластрипаин 50 : 1). Гидролизат хроматографировали на анионообменной колонке Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Швеция) на хроматографе FPLC-System (Pharmacia, Швеция) в градиенте концентрации NaCl (0→1 М) в 20 мМ трис-НСl (рН 7,6). Градиент создавался автоматически.

Разделение пептидов методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex 322 (Altex, США) с проточным спектрофотометром Hitachi, модель 100-40 (Hitachi, Япония); пептиды детектировали спектрофотометрически по поглощению при 206 и 280 нм. Хроматографию пептидов проводили на колонке (0,4×20 см) с Nucleosil 5C18 (Macherey und Nagel, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила (0—70%) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты со скоростью 0,8 мл/мин.

Аминокислотный анализ солянокислых гидролизатов, полученных при инкубации 2—5 нмоль Trp-гРНК-синтетазы или пептидов с 5,7 н. HCl в течение 24 ч при 105° С, проводили на автоматическом анализаторе D500 (Durrum, США).

Аминокислотную последовательность пептидов определяли на газофазном секвенаторе 470 А (Applied Biosystems, США) по стандартной программе; идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот проводили методом ВЭЖХ [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schimmel P. // Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 125—158.
2. Thömmes P., Fett R., Schray B., Kunze N., Knippers R. // Nucl. Acid. Res. 1988. V. 16. № 12. P. 5391—5406.
3. Tsui F. W. L., Siminovich L. // Nucl. Acid. Res. 1987. V. 51. № 8. P. 3349—3367.
4. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. // Meth. Enzymol. 1979. V. 59. P. 234—257.
5. Merle M., Trezequel V., Gandar J.-C., Labouesse B. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 6. P. 2244—2252.
6. Kisselev L. L., Favorova O. O., Nurbekov M. K., Smitrienko S. G., Engelhardt W. A. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 120. № 3. P. 511—517.
7. Kisselev L. L., Kovaleva G. K. // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1987. V. 7. P. 137—186.
8. Gros C., Lemaire G., van Rapenbush R., Labouesse B. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 9. P. 2931—2943.
9. Matsuo H., Fujimoto Y., Tatsuno T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V. 22. № 1. P. 69—74.
10. Берестень С. Ф., Заргарова Т. А., Костров С. В., Фаворови О. О. // Молекулярная биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1407—1411.
11. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
12. Smith E. L., Hill R. L. // The Enzymes. V. 4. / Eds Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. N. Y.: Acad. Press. 1960. P. 37.
13. Левица Н. В., Слепая В. З., Киселев О. Г., Шемлякин В. В., Хохлачев А. А. // Био-орган. химии. 1989. Т. 15. № 1. С. 24—31.

Поступила в редакцию
30.1.1989

AMINO ACID SEQUENCE OF SOME PEPTIDES OF THE BOVINE
PANCREAS TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE

ZARGAROVA T. A., KOVALEVA G. K., FAVOROVA O. O., LEVINA N. B.*,
TELEZHINSKAYA I. N.*

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

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

Method of isolation of the bovine pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase is improved and a protein with $\geq 99\%$ purity, according to PAGE - SDS, is obtained. The pure enzyme is digested with clostripain and the hydrolysate is separated by FPLC anion-exchange chromatography followed by reversed phase HPLC. Amino acid sequences of 6 individual peptides, including C-terminal one, were determined by the automated Edman degradation. A peptide is also revealed which is encoded with the low degeneracy.