



УДК 579.222'112 + 577.112.08.3

© 1990 г.

*А. В. Родионов, Л. С. Белоусова, И. П. Исачкова,
Г. Н. Плужникова, Б. А. Дмитриев, Е. В. Молокова*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩЕВИДОВОГО БЕЛКА НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *RICKETTSIA PROVAZECII*

*Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР,
Москва*

Впервые выделен хроматографически чистый общевидовой белок наружной мембраны риккетсий Провачека и определен его аминокислотный состав. Методом хроматофокусирования установлено, что белок имеет pI 4,18 \pm 0,03. В гидролизате белка обнаружены три основных нингидринположительных соединения, отличающиеся от обычных аминокислот. Получены данные, свидетельствующие о том, что белок имеет субъединичную структуру.

Риккетсии, являющиеся подобно вирусам облигатными внутриклеточными паразитами [1], до сравнительно недавнего времени выделяли в особую группу микроорганизмов, занимавших в классификационной иерархии промежуточное положение между вирусами и бактериями. Однако в работах конца 70-х годов риккетсии стали называть бактериями, причем для этого были весьма серьезные основания. Действительно, клеточная оболочка риккетсий состоит из наружной и внутренней мембран, между которыми расположено периплазматическое пространство [2, 3], а вся клетка окружена полисахаридной капсулой [2, 4]. Кроме того, в риккетсиях обнаружены липополисахарид [3, 5, 6] и пептидогликан [7]. Таким образом, вполне справедливо утверждение автора обзора [8], что риккетсии «являются относительно типичными граммотрицательными бактериями».

Наружная мембрана риккетсий Провачека содержит 6 белков [3, 9], один из которых является общевидовым протективным антигеном [10]. Его относительная молекулярная масса, по данным разных авторов, составляет 80 000—135 000 [3, 9—12]. Именно этому антигену исследователи уделяют особое внимание, поскольку на его основе, по-видимому, можно создать протективный препарат, выгодно отличающийся от применяемых в настоящее время сыпнотифозных вакцин, которые содержат балластные компоненты не только самих риккетсий, но и клеток хозяина. Выделению и химической характеристике общевидового протективного антигена риккетсий Провачека (Rp-1-белка) и посвящена настоящая работа.

Согласно данным работы [13], высвобождению Rp-1-белка из оболочки риккетсий препятствуют буферы с высокой ионной силой, в частности 0,15 M NaCl. Поскольку при получении «растворимого антигена» используют физиологический раствор, логично было предположить, что в ходе обработки инфицированных желточных мешков Rp-1-белок остается преимущественно связанным с наружной мембраной риккетсий и для предварительного обогащения препарата по этому белку может оказаться пригодной ультрафильтрация через мембрану с большим диаметром пор. Действительно, ультрафильтрация через мембрану XM-300 (предел исключения 300 кДа) не привела к заметным потерям не только Rp-1-белка (в фильтрате этот белок не обнаружен), но и других антигенов риккетсий

Принятые сокращения: Rp-1-белок — общевидовой белок наружной мембраны риккетсий Провачека; SDS — додецилсульфат натрия.

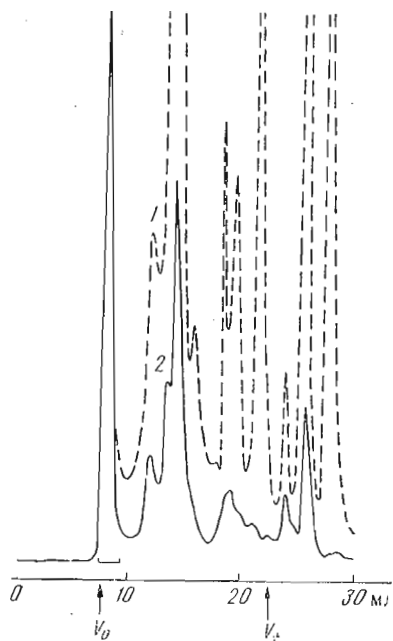


Рис. 1. Анализ препаратов исходного (1) и полученного после трех циклов ультрафильтрации (2) «растворимого антигена» (см. «Экспер. часть») на колонке Superose 12TMHR 10/30 (предел эксклюзии $2 \cdot 10^6$ Да) в 50 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl (рН 7,5). Скорость элюирования 0,5 мл/мин, V_0 и V_t — свободный и полный объем колонки. Отмечены фракции, содержавшие основное количество антигенов риккетсий

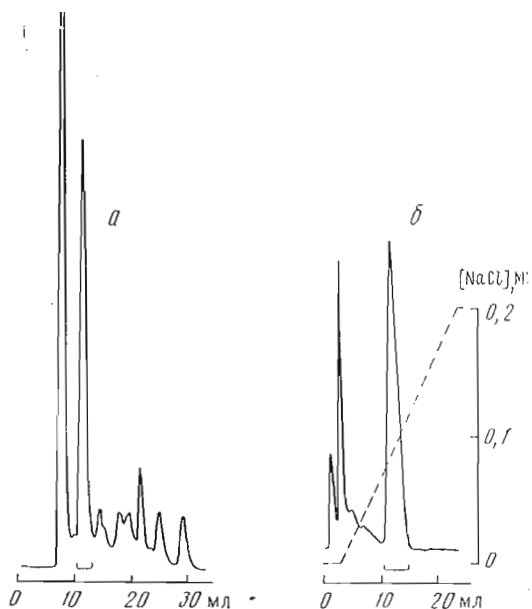


Рис. 2. Выделение Rр-1-белка из экстракта мембран риккетсий: а — гель-хроматография экстракта (условия см. в подписи к рис. 1); б — очистка фракции, выделенной гель-хроматографией, на колонке Mono QTMHR 5/5 в 25 мМ пиперазин-НСl-буфере (рН 5,7), форма градиента концентрации NaCl показана штриховой линией. Скорость элюирования в обоих случаях составляла 0,5 мл/мин. Отмечены фракции, в которых присутствовал Rр-1-белок

(отношение титров фильтрата и концентрата составляло 2^{10}) и позволила избавиться от значительного количества балластных компонентов (ср. кривые 1 и 2 на рис. 1).

Процедура очистки мембранной фракции, содержавшей основное количество антигенов риккетсий, включала в себя следующие стадии: дробное осаждение сульфатом аммония, промывание осадка гипотоническим буфером и гель-хроматографию мембран. По аналогии с методикой извлечения Rр-1-белка из чистых живых риккетсий [13] полученные мембраны экстрагировали 10 мМ трис-НСl-буфером (рН 7,6) при 45°C . Из экстракта, освобожденного от наиболее крупных фрагментов мембран путем ультрацентрифугирования, в две хроматографические стадии выделен Rр-1-белок (рис. 2). Полученный препарат не содержал компонентов желточного мешка куриного эмбриона (данные иммуоферментного анализа). Его чистота подтверждена также методом хроматофокусирования (рис. 3). Найденное значение rI белка составляет $4,18 \pm 0,03$ (средняя величина пяти определений).

Ключевая стадия описанной схемы выделения Rр-1-белка — его извлечение из мембран путем их экстракции 10 мМ трис-НСl-буфером при 45°C . На предыдущих этапах обработка мембран этим буфером фигурирует дважды, однако в обоих случаях, несмотря на продолжительное озвучивание суспензии при $20\text{--}25^\circ \text{C}$, Rр-1-белок оставался связанным с мембраной (в раствор переходили преимущественно эмбриональные белки, имеющие rI от 4,4 до 4,9 и по объему удерживания на колонке Superose 12TM практически совпадающие с Rр-1-белком). Этот результат позволяет предположить, что для извлечения Rр-1-белка из наружных

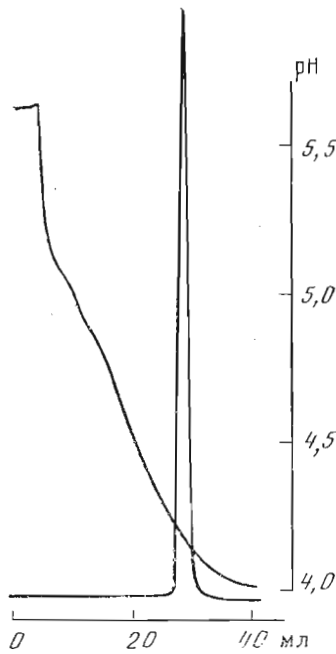


Рис. 3

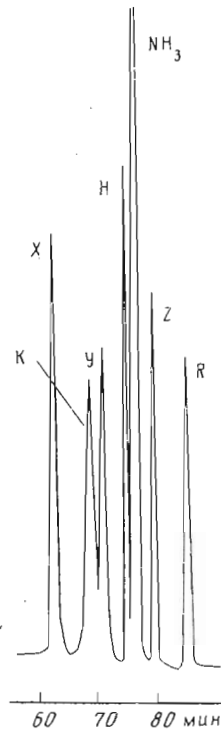


Рис. 5

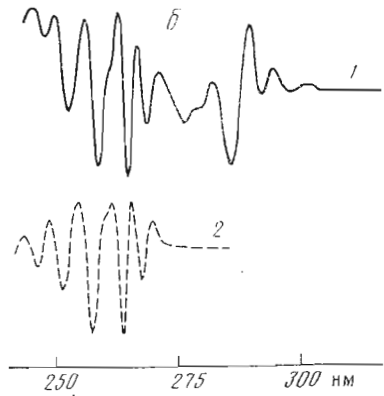
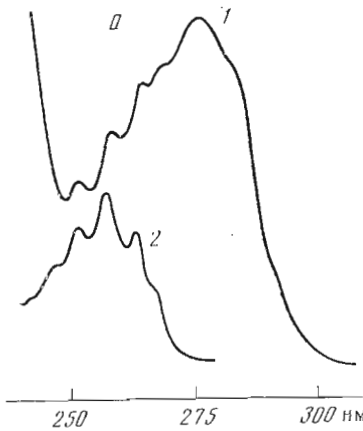


Рис. 4

Рис. 3. Оценка чистоты препарата Rр-1-белка, выделенного из экстракта мембран риккетсий (см. рис. 2), методом хроматофокусирования на колонке Mono PTMHR 5/20. Стартовый буфер — 25 мМ пиперазин-НСl, рН 5,7; элюент — разбавленный в 10 раз полибуфер 74, доведенный до рН 4,0 путем добавления НСl; скорость элюирования 0,5 мл/мин

Рис. 4. Спектры поглощения (а) Rр-1-белка (1) и фенилаланина (2) и вторые производные этих спектров (б)

Рис. 5. Фрагмент хроматограммы гидролизата Rр-1-белка, полученной в режиме элюирования по программе Р-1 [15]. X, Y и Z — идентифицированные компоненты; K, R, H — соответственно лизин, аргинин, гистидин

мембран риккетсий решающее значение имеет не ионная сила буфера, а температура. По-видимому, этот белок достаточно прочно связан с мембраной при температурах ниже температуры фазового перехода липидов из жидкокристаллического в жидкое состояние.

**Аминокислотный состав общевицевого белка наружной мембраны
*Rickettsia prowazekii***

| Аминокислотный остаток | Относительное содержание *, ммоль на 1 ммоль His | Число остатков на 1 остаток Trp, целочисленные значения | Масса, кДа |
|------------------------|--|---|------------|
| Asx | 18,08 | 72 | 8,2872 |
| Thr | 11,91 | 48 | 4,8538 |
| Ser | 6,56 | 26 | 2,2643 |
| Glx | 6,95 | 28 | 3,6156 |
| Pro | 3,03 | 12 | 1,1656 |
| Gly | 12,49 | 50 | 2,8535 |
| Ala | 10,04 | 40 | 2,8436 |
| Cys | 0,05 ** | ? | |
| Val | 6,05 | 24 | 2,3808 |
| Met | 0,53 | 2 | 0,2624 |
| Ile | 8,03 | 32 | 3,6214 |
| Leu | 7,93 | 32 | 3,6214 |
| Tyr | 1,05 | 4 | 0,6528 |
| Phe | 4,03 | 16 | 2,3550 |
| Trp | 0,25 ** | 1 | 0,1862 |
| Lys | 0,97 | 4 | 0,5128 |
| His | 1,00 | 4 | 0,5486 |
| Arg | 1,01 | 4 | 0,6248 |
| | | Сумма | 40,6498 |

* Усредненные значения, полученные при анализе 5 гидролизатов. Относительная ошибка определения большинства аминокислот составляла не более 5%. Количество обнаруженного в гидролизатах аммиака 9 ммоль на 1 ммоль His.

** Результат анализа одного гидролизата.

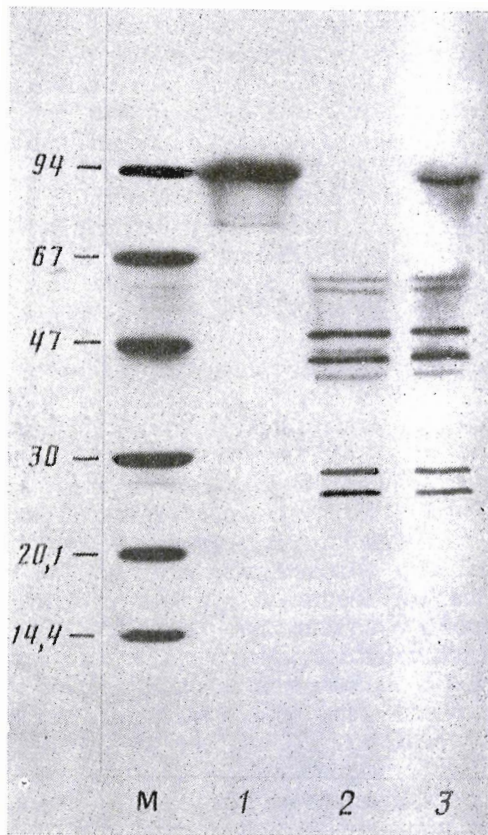
Весьма примечательная особенность выделенного белка — форма его полосы поглощения (кривая *I* на рис. 4а): наряду с основным максимумом при 277 нм видны еще по меньшей мере четыре в более коротковолновой области. В этом спектральном диапазоне расположены максимумы полосы поглощения фенилаланина (ср. кривые *I* и *2* на рис. 4а), поэтому естественно предположить, что среди хромоформных групп Рр-1-белка, поглощающих в ближней УФ-области, явно преобладают остатки именно этой аминокислоты. Чтобы проверить это предположение, проведен сравнительный анализ спектров поглощения Рр-1-белка и фенилаланина.

Из рис. 4б видно, что в диапазоне 240—275 нм вторые производные этих спектров очень схожи. Пожалуй, практически единственное различие состоит в том, что все экстремумы кривой *I* смещены на 1,4—1,5 нм в длинноволновую область. Такой гипсохромный сдвиг обусловлен скорее всего гидрофобным окружением остатков фенилаланина в белковой глобуле. Вторая производная позволяет оценить относительное содержание остатков ароматических аминокислот в белке. Если поглощение Рр-1-белка в ближней УФ-области обусловлено только этими остатками, то, согласно расчету, выполненному в соответствии с работой [14], а также результатам моделирования спектра поглощения этого белка с использованием смесей ароматических аминокислот, на один остаток триптофана должно приходиться 4—5 остатков тирозина и 16—17 остатков фенилаланина. Это предсказание полностью подтвердилось: найдено, что остатки Trp, Tyr и Phe присутствуют в белке в соотношении 1 : 4 : 16 (таблица).

В гидролизате Рр-1-белка наряду с обычными аминокислотами обнаружены еще три нингидринположительных соединения, элюирующихся в области основных аминокислот (рис. 5). Отношение площадей пиков (*S*) этих соединений, обозначенных нами буквами X, Y и Z, к площади пика ближайшей по времени удерживания аминокислоты (т. е. отношения S_X/S_K , S_Y/S_K и S_Z/S_R) лишь незначительно больше единицы и практически не меняется при увеличении времени гидролиза от 24 до 72 ч.

Если не принимать во внимание найденное относительное содержание

Рис. 6. Анализ Rp-1-белка методом SDS-электрофореза в градиентном (7—20%) полиакриламидном геле. Препараты солибилизировали 2 ч 2% SDS при 20 (1) или 95° С (2, 3) в присутствии (1, 2) или в отсутствие (3) меркаптоэтанола. М — набор маркерных белков. Слева приведена их молекулярная масса в килодальтонах



остатков Cys в белке, которое вряд ли можно считать достоверным, и не учитывать вклада остатков X, Y и Z, структура которых пока не установлена, то минимальная молекулярная масса Rp-1-белка составляет 40,6 кДа. При оценке молекулярной массы методом гель-хроматографии нами получена величина 230 ± 30 кДа. Фигурирующие же в литературе значения M_r этого белка (80 000—135 000), найденные при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS, соответственно в 2—3 раза больше или во столько же раз меньше приведенных выше. Естественно, возникает вопрос о причинах столь существенных расхождений.

Одно из наиболее тривиальных объяснений зависимости кажущейся молекулярной массы от метода и условий ее определения заключается в том, что белок имеет субъединичную структуру. В пользу такого предположения свидетельствуют данные электрофореза (рис. 6): белок, солибализированный 2% SDS при 20° С, на электрофореграмме обнаруживается в виде единственной интенсивной полосы (M_r 94 000), под которой расположена диффузная зона (набор очень слабых полос, нижний предел M_r 80 000), тогда как длительное инкубирование препарата при 95° С приводит к появлению целого набора полос, наиболее интенсивным из которых отвечают значения M_r 25 500, 28 000, 45 000 и 49 000. Некоторое непринципиальное различие электрофореграмм образцов, инкубированных в присутствии и в отсутствие восстановителя (ср. дорожки 2 и 3 на рис. 6), вряд ли можно рассматривать как указание на наличие дисульфидных связей в белке. Возможно, как и в случае α -маннозидазы из *Canavalia ensiformis*, вообще не содержащей остатков Cys, меркаптоэтанол просто способствует диссоциации белка на субъединицы [16].

Совокупность приведенных выше результатов, на наш взгляд, позволяет предположить, что общеизвестной белок наружной мембраны риккетсий Провачека состоит из нескольких, по-видимому различных, субъединиц. Для более определенных выводов о структурной организации этого

белка явно необходима дополнительная информация. В частности, пока неясно, чем обусловлено обилие полос на электрофореграмме белка, отражает ли набор наиболее интенсивных полос реальное число разных субъединиц или в соседних зонах присутствуют идентичные по структуре полипептиды, связавшие разное количество молекул SDS. Остаются открытыми также вопросы о структуре и происхождении обнаруженных в гидролизате белка компонентов X, Y и Z, о содержании этих компонентов в отдельных субъединицах этого белка и в аналогичных белках риккетсий Провачека других штаммов. Ответить на эти вопросы предстоит в ходе дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

В работе использован вирулентный штамм Брейнль риккетсий Провачека. Исходным материалом для выделения Rp-1-белка служил так называемый растворимый антиген, представляющий собой обработанный эфиром гомогенат клеток риккетсий и желточных мешков куриных эмбрионов. Процедуры культивирования риккетсий в 7-дневных куриных эмбрионах и получения «растворимого антигена» описаны в работах [17, 18].

Для выделения Rp-1-белка и анализа состава препаратов на всех стадиях его очистки использовали хроматографическую систему FPLC (Pharmacia, Швеция) и колонки этой же фирмы. Условия хроматографии приведены в подписях к рисункам. Об относительном содержании антигенов риккетсий в препаратах и о присутствии компонентов желточного мешка куриного эмбриона судили по данным иммуноферментного анализа. Соответствующие кроличьи антисыворотки любезно предоставлены И. В. Тарасевич. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой аффинно очищенные козьи иммуноглобулины против глобулинов кролика. Rp-1-белок обнаруживали методом хроматофокусирования: о присутствии этого белка в анализируемых фракциях свидетельствовал пик, элюировавшийся при $\text{pH } 4,18 \pm 0,03$ (при помощи моноклональных антител, любезно предоставленных Э. И. Дробышевской и Ю. А. Недялковым, в отдельном эксперименте показано, что только этот пик отвечает Rp-1-белку).

Предварительное фракционирование «растворимого антигена» осуществлено по следующей методике. Препарат разбавляли в 3 раза 50 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 0,15 М NaCl, 0,1% NaN₃ и 0,1 мМ фенолметансульфонилфторид, и концентрировали до исходного объема в ячейке для ультрафильтрации (Amicon, Нидерланды) с использованием мембраны XM-300 той же фирмы. Эту процедуру повторяли еще дважды. Фильтраты, содержавшие лишь незначительное количество антигенов риккетсий, отбрасывали, а к концентрату добавляли сульфат аммония из расчета 60 мг на 1 мл исходного раствора. Смесь выдерживали 16 ч при 4° С, от выпавшего осадка освобождались центрифугированием (10 000 g, 20 мин, 4° С; отношение титров осадка и супернатанта составило 2¹¹). Антигены риккетсий высаливали сульфатом аммония (120 мг сульфата аммония на 1 мл супернатанта), осадок суспендировали в 10 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,6 (буфер А), суспензию диализовали против того же буфера, озвучивали (4 × 30 с, 20° С) при максимальной мощности дезинтегратора MSE-100 (Англия) и подвергали ультрацентрифугированию (250 000g, 4° С). Осадок суспендировали в буфере А при озвучивании, смесь хроматографировали на колонке Superose 12TM HR 10/30 в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl. Фракции мембран, элюирующиеся в свободном объеме колонки, объединяли, диализовали против воды и лиофилизировали.

Мембраны суспендировали в буфере А, смесь инкубировали 4 ч при 45° С, а затем центрифугировали (250 000g, 4 ч, 4° С). Полученный супернатант использовали далее для выделения Rp-1-белка.

Аминокислотный анализ чистого белка проводили по программам Р-1 и Р-3, описанным в работе [15]. Белок гидролизовали 6 н. HCl при 115° С в течение 24, 48 и 72 ч. Цистеин определяли в виде его S-2-(пирри-

дил-4)этилпроизводного. Модификация белка 4-винилпиридином выполнена по аналогии с известной методикой [19] (основное отличие состояло в том, что в качестве восстановителя нами использован меркаптоэтанол). Для определения содержания остатков Trp белок гидролизовали 4 н. метансульфокислотой, содержащей 0,2% триптамина [20].

Спектры поглощения сняты на приборе UVIDEC-610 (Jasco, Япония).

Авторы выражают благодарность И. К. Вернер за участие в работе на стадии предварительного фракционирования «растворимого антигена» методом ультрафильтрации и А. М. Сурину (ВНИИ биотехнологии) за съемку спектров поглощения и помощь в их интерпретации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smith D. T.* // *Zinsser Microbiology* / Eds Joklik W. K., Smith D. T. N.Y.: Appleton — Century — Crofts, 1972. P. 671—684.
2. *Silverman D. J.*, *Wisseman C. L., Jr.* // *Infect. and Immun.* 1978. V. 21. № 3. P. 1020—1023.
3. *Smith D.*, *Winkler H.* // *J. Bacteriol.* 1979. V. 137. № 2. P. 963—971.
4. *Silverman D. J.*, *Wisseman C. L., Jr.*, *Waddell A. D.*, *Jones M.* // *Infect. and Immun.* 1978. V. 22. № 1. P. 233—246.
5. *Schramek S.*, *Brezina R.*, *Tarasevich I. V.* // *Acta virol.* 1976. V. 20. № 3. P. 270.
6. *Schramek S.*, *Brezina R.*, *Kazar J.* // *Acta virol.* 1977. V. 21. № 5. P. 439—441.
7. *Myer W. F.*, *Ormsbee R. A.*, *Osterman J. V.*, *Wisseman C. L., Jr.* // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1967. V. 125. № 2. P. 459—462.
8. *Hase T.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1985. V. 39. P. 69—88.
9. *Osterman J.*, *Eiseman C.* // *Infect. and Immun.* 1978. V. 21. № 3. P. 866—873.
10. *Dasch G. A.*, *Bourgeois A. L.* // *Rickettsiae and rickettsial diseases* / Eds Burgdorfer W., Anacker R. L. N. Y.: Acad. Press, 1981. P. 61—70.
11. *Smith D. K.*, *Winkler H. H.* // *Infect. and Immun.* 1980. V. 29. № 2. P. 831—834.
12. *Зезеров Е. Г.*, *Логинов В. С.*, *Березнева А. С.* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1985. № 6. С. 6—13.
13. *Dasch G. A.* // *J. Clin. Microbiol.* 1981. V. 14. № 3. P. 333—341.
14. *Levine R. L.*, *Federici M. M.* // *Biochemistry.* 1982. V. 21. № 11. P. 2600—2606.
15. *Родионов А. В.* // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 581—588.
16. *Einhoff W.*, *Kummer H.*, *Rüdiger H.* // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1987. V. 368. № 4. P. 405—407.
17. *Голиневич Е. М.* // Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней / Ред. Здродовский П. Ф., Соколов М. И. М.: Медицина, 1965. С. 513—520.
18. *Балаева Н. М.*, *Гулевская С. А.* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1970. № 4. С. 110—114.
19. *Andrews P. C.*, *Dixon J. E.* // *Anal. Biochem.* 1987. V. 161. № 2. P. 524—528.
20. *Simpson R. J.*, *Neuberger M. R.*, *Liu T. Y.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 7. P. 1936—1940.

Поступила в редакцию
14.VII.1989

A. V. RODIONOV, L. S. BELOUSOVA, I. P. ISACHKOVA, G. N. PLUZHNIKOVA,
B. A. DMITRIEV, E. V. MOLOKOVA

ISOLATION AND PRIMARY CHARACTERIZATION OF THE COMMON SPECIES-SPECIFIC OUTER MEMBRANE PROTEIN OF *RICKETTSIA PROWAZEKII*

N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Common species-specific protein is isolated for the first time in the chromatographically pure state from the outer membrane of *Rickettsia prowazekii*, and its amino acid composition is determined. As revealed by chromatofocusing technique, the protein possesses $pI\ 4,18 \pm 0,03$. Three basic ninhydrine-positive compounds, differing from usual amino acids, were discovered in the protein hydrolyzate. Data suggesting the subunit structure of the isolated protein are presented.