



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.4

ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ЛЕГГЕМОГЛОБИНА I ИЗ КЛУБЕНЬКОВ ЖЕЛТОГО ЛЮПИНА

Егоров Ц. А., Фейгина М. Ю., Казаков В. К.,
Шахпаронов М. И., Миталева С. И., Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

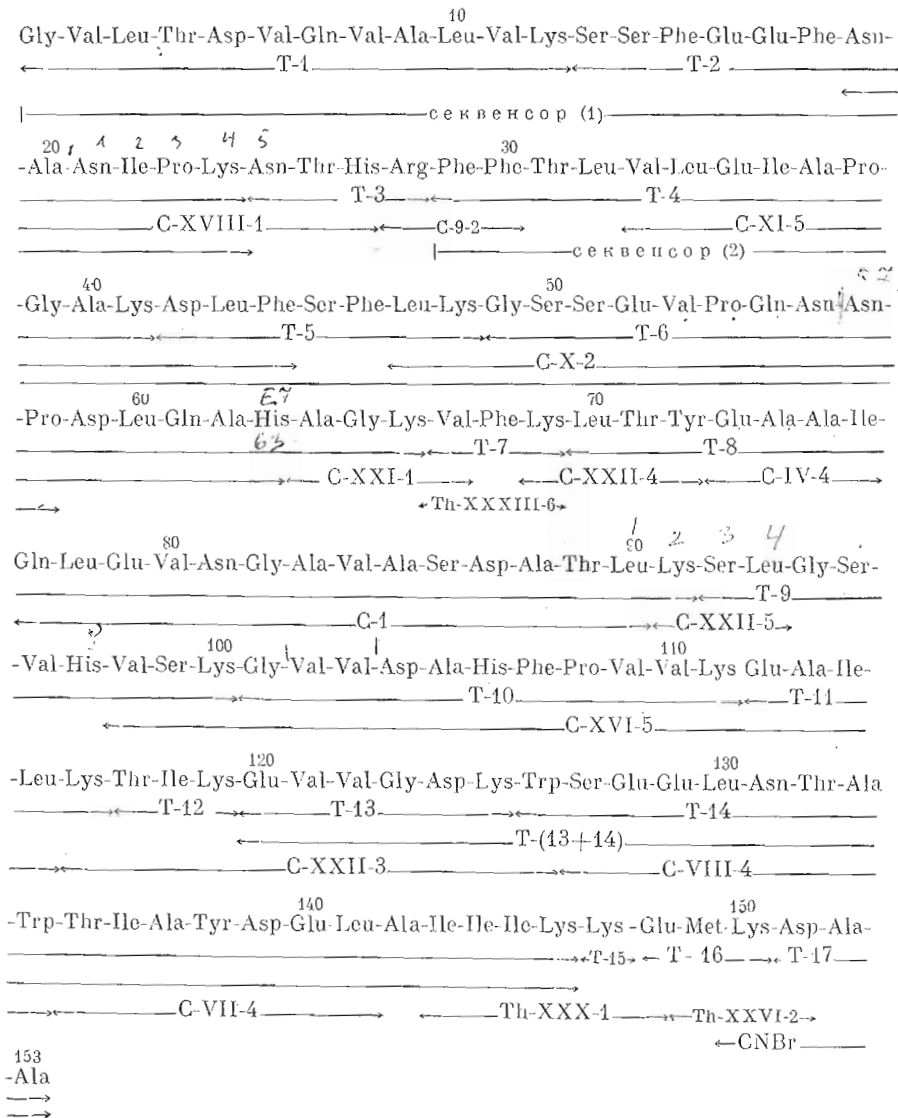
Леггемоглобин, кислородсвязывающий гемопротеид растительного происхождения, подобно миоглобину состоит из одной полипептидной цепи и имеет в качестве простетической группы железопротопорфирин IX. Этот растительный белок, по-видимому, играет важную роль в симбиотической системе фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых растений, поскольку имеется прямая зависимость между его появлением и способностью клубеньков к азотфиксации. Хотя точная функция леггемоглобина еще не выяснена, уже можно утверждать, что определение структуры и функции этого белка и его роли в системе фиксации азота представляет не только теоретический, но и большой практический интерес.

Леггемоглобин был выделен из клубеньков ряда бобовых растений и охарактеризован [1—7]. При этом было показано, что в клубеньках этих растений содержится по меньшей мере два различающихся компонента этого белка. В настоящее время известны аминокислотные последовательности одного компонента леггемоглобина сои [8] (см. также исправления структуры [9, 10]), фасоли [6] и кормовых бобов [5]. В данной работе определена полная аминокислотная последовательность одного из компонентов леггемоглобина из клубеньков желтого люпина — леггемоглобина I.

Желтый люпин (*Lupinus luteus* L.) сорта «Быстрорастущий 4» выращивали в полевых условиях Московской области. Леггемоглобин выделяли в мет-форме путем дробного высаливания сульфатом аммония (собирали фракцию 60—80% насыщения) с последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman). Дальнейшую очистку леггемоглобина и разделение его на компоненты проводили хроматографией на DEAE-сефадексе А-50 («Farmacia», Швеция) в градиенте pH трис-хлоридных буферных растворов (pH 8,1—7,1).

Для определения аминокислотной последовательности леггемоглобина I использовали следующие типы фрагментации белка: гидролиз трип-

сином, химотрипсином, термолизином и расщепление бромцианом *. Гем предварительно отделяли кислым ацетоном при -10° [11]. Пептиды разделяли и очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонках, а также высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге. Детали этой части работы, так же как и метод выделения и характеристика белка, будут опубликованы позднее. N-Концевую последовательность глобина определяли на секвенсоре модели 890С («Beckman», США) с идентификацией фенолтиогидантоинов аминокислот с помощью ГЖХ, ТСХ и масс-спектрометрии. Таким путем удалось четко определить 24 аминокислотных остатка с N-концевого участка глобина (схема). Анализ C-кон-



Полная аминокислотная последовательность леггемоглобина I из клубеньков желтого люпина. Секвенсор (1) — определение аминокислотной последовательности интактной полипептидной цепи леггемоглобина I с помощью секвенсора; секвенсор (2) — определение аминокислотной последовательности фрагмента, полученного в результате гидролиза сукцинилированной полипептидной цепи леггемоглобина I трипсином (детали см. текст)

* Сокращения: T, C, Th, CNBr — пептиды, полученные в результате гидролиза полипептидной цепи леггемоглобина I трипсином, химотрипсином, термолизином и расщепления бромцианом соответственно.

цевой последовательности белка с помощью карбоксипептидаз А и В («Worthington», США) и анализ структуры бромцианового фрагмента (в леггемоглобине I содержится один остаток метионина) позволили определить последовательность аминокислот на С-концевом участке полипептидной цепи белка: -Lys-Asp-Ala.

В результате гидролиза белка трипсином были выделены практически все пептиды, составляющие полипептидную цепь леггемоглобина I. Не удалось выделить в чистом виде только один пептид Т-4 (см. схему). Однако аминокислотная последовательность данного участка полипептидной цепи была однозначно определена с помощью секвенсора путем прямого анализа аминокислотной последовательности большого фрагмента белка, начинающегося с остатка Phe-29. Этот фрагмент был получен в результате ограниченного гидролиза белка трипсином по остатку Arg-28 (в леггемоглобине I содержится один остаток аргинина). Остатки лизина, так же как и NH₂-группа N-концевой аминокислоты белка, предварительно блокировались 50-кратным избытком янтарного ангидрида. Таким путем, не разделяя полученные фрагменты, удалось определить 30 аминокислотных остатков. Кроме того, при гидролизе белка химотрипсином был выделен пептид С-ХI-5, который в значительной мере перекрывает район пептида Т-4 (см. схему). В результате гидролиза белка химотрипсином было выделено 20 пептидов и определена их структура, что без учета перекрывающихся фрагментов составляет 129 аминокислотных остатков леггемоглобина I. Для расстановки триптических пептидов в необходимой последовательности был использован также гидролиз белка термолизинном, проведенный на смеси двух компонентов. Из термолитического гидролизата было выделено 32 пептида, относящихся к леггемоглобину I, которые составляют 103 аминокислотных остатка полипептидной цепи белка. Одновременно была получена информация о перекрывании триптических пептидов второго компонента леггемоглобина люпина — леггемоглобина II.

Анализ структуры пептидов, полученных в результате вышеперечисленных способов фрагментации, позволил полностью реконструировать полипептидную цепь леггемоглобина I. Как видно из схемы, полипептидная цепь леггемоглобина I люпина состоит из 153 аминокислотных остатков, что находится в хорошем согласии с результатами аминокислотного анализа глобина, рассчитанного на основе содержания одного остатка аргинина на молекулу глобина. Следовательно, апопротеин имеет *M* 16 621, а собственно леггемоглобин I — 17 238.

Сравнение аминокислотной последовательности леггемоглобина I люпина с аминокислотной последовательностью трех других леггемоглобинов (сои, фасоли и кормовых бобов) позволяет сделать несколько общих выводов. Прежде всего все леггемоглобины отличаются по длине полипептидной цепи. Наибольшее число остатков (153) имеет леггемоглобин I люпина. В этом он подобен миоглобину. Все леггемоглобины известной структуры имеют около 45% сходства по аминокислотной последовательности. Существенная разница между леггемоглобином I люпина и другими леггемоглобинами заключается в расположении дистального (E7) и проксимального (F8) гистидинов, если считать, что их функцию в леггемоглобине I люпина несут остатки His-63 и His-97 соответственно. У подавляющего числа глобинов между дистальным и проксимальным гистидинами находится 28 аминокислотных остатков, тогда как в леггемоглобине I люпина — 33. По данным рентгеноструктурного анализа леггемоглобина люпина*, выполненного Ванштейном и сотр. [12] с разрешением 5Å,

* Путем прямого анализа с помощью секвенсора N-концевой последовательности образца белка, использованного Вайнштейном и сотрудниками для рентгеноструктурного анализа, нами было показано, что этот белок является вторым компонентом леггемоглобина люпина. Можно предполагать, что оба компонента леггемоглобина люпина имеют одинаковую третичную структуру.

F-спираль примерно на 5 остатков больше по сравнению с миоглобином. Абсолютно инвариантными остатками, как и во всех известных глобинах, остаются His-97(F8) и Phe-44(CD1), а также другие аминокислоты, существенные для окружения гема и функционирования молекулы: Leu-3(NA3), Pro-38(C2), Phe-46(CD4), His-63(E7), Val-67(E11), Leu-93(F4). Остальные аминокислоты, важные для семейства глобинов, заменяются в леггемоглобине I люпина следующим образом: Ser(A1) на Thr, Trp(A12) на Phe, Gly(B6) на Thr, Thr (C4) на Ala. Важный для миоглобина и гемоглобина остаток Tyr(H22) отсутствует в леггемоглобине I люпина. Роль отдельных аминокислот и взаимодействие гема с различными участками молекулы леггемоглобина I люпина могут быть выяснены при дальнейшем исследовании этого белка.

В заключение авторы выражают благодарность И. Е. Федуловой, Н. В. Довгас и И. В. Назимову за непосредственное участие в отдельных этапах настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellfolk N. (1961) *Acta chem. scand.*, **15**, 545—554.
2. Пейве Я. В., Аттанасов Б. П., Жизневская Г. Я. и Краснобаева Н. Н. (1972) Докл. АН СССР, **206**, 482—485.
3. Мелик-Саркисян С. С., Яровенко В. В., Шапошников Г. Л., Владзиевская Л. П. и Кретович В. Л. (1974) *Биохимия*, **39**, 711—718.
4. Broughton W. J., Dilworth M. J. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **317**, 266—276.
5. Richardson M., Dilworth M. J. and Scawen M. D. (1975) *FEBS Lett.*, **51**, 33—37.
6. Lehtovaara P. and Ellfolk N. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 577—584.
7. Broughton W. J., Dilworth M. J. (1971) *Biochem. J.*, **125**, 1075—1080.
8. Ellfolk N. and Sievers G. (1971) *Acta chem. scand.*, **25**, 3532—3534.
9. Aggarval S. J. and Riggs A. (1970) *Acta chem. scand.*, **24**, 2234—2236.
10. Ellfolk N. and Sievers G. (1974) *Acta chem. scand.*, **B28**, 1245—1246.
11. Anson M. L. and Mirsky A. E. (1930) *J. Gen. Physiol.*, **13**, 469—476.
12. Вайнштейн Б. К., Арагюнян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. И., Павловский А. Г., Гребенко А. И. и Конарева Н. В. (1974) *Кристаллография*, **19**, 971—979.

Поступила в редакцию
29. X. 1975