



УДК 577.158

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО ЦИСТЕИН
АКТИВНОГО ЦЕНТРА
D-ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫСЫ

*Вайбаков Б. А., Желтова А. О., Белянова Л. П.,
Баратова Л. А., Воспелъникова Н. Д., Сафронова М. И.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Из триптического гидролизата *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц крысы выделен 17-членный пептид, содержащий цистеин активного центра, и установлена его аминокислотная последовательность: Ile-Val-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys. Последовательность выделенного пептида полностью гомологична последовательности аналогичных пептидов, выделенного из *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ из других источников.

Одной из задач современной энзимологии является сравнительное изучение особенностей структуры и каталитического действия ферментов, осуществляющих одну и ту же реакцию, но выделенных из различных источников. Очень интенсивно в этом направлении изучается *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*D*-глицеральдегид-3-фосфат: NAD⁺-оксидоредуктаза (фосфорилирующая), КФ 1.2.1.12) — ключевой фермент гликолиза.

В активный центр фермента входит остаток цистеина [1]. В настоящее время пептиды, содержащие цистеин активного центра, выделены и охарактеризованы для ряда дегидрогеназ [2]. Эти пептиды обладают уникальной по постоянству аминокислот последовательностью из 17 аминокислотных остатков.

В данной работе предметом изучения служила *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, выделенная из скелетных мышц крысы. Этот фермент, как и все ранее изучавшиеся из других источников, состоит из 4 химически идентичных субъединиц. Общее число SH-групп в нем равно 16 на 1 моль белка (по 4 на каждую субъединицу).

Изучаемая дегидрогеназа по сравнению с гомологичными ферментами из других источников обладает рядом особенностей. Фермент, в частности, чрезвычайно лабилен, характеризуется повышенной реакционной способностью SH-групп: в отсутствие восстановителей, таких, как 2-меркаптоэтанол и дитиотреит, фермент теряет активность [3, 4]. Эти данные позволяют предположить, что многие отличительные черты дегидрогеназы из мышц крысы могут быть связаны с особенностями локализации цистеиновых остатков в полипептидной цепи белковой молекулы, их аминокислотным окружением (в первичной или третичной структуре). В связи с этим определение местоположения и аминокислотного окружения остатков цистеина в изучаемом белке представляет несомненный интерес.

Сокращение: S-CM-Cys — S-карбоксиметилцистеин.

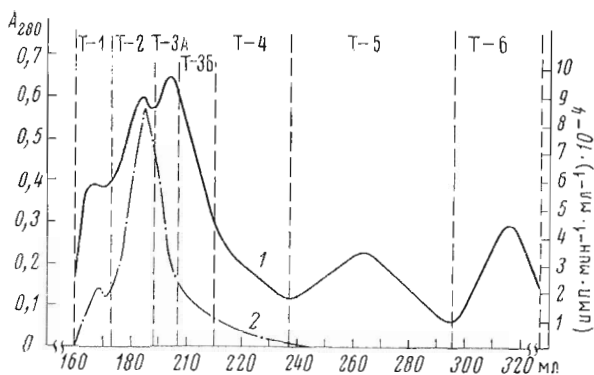


Рис. 1. Гель-фильтрация триптического гидролизата карбоксиметилированного белка через сефадекс G-25 в 0,1 М бикарбонате аммония, pH 8. Колонка 1,8 × 150 см. Температура 27°, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракции 3 мл. 1 — оптическая плотность, 2 — радиоактивность

При проведении модификации апофермента иодацетатом SH-группы белка удалось подразделить по их реакционной способности на 3 категории. В реакцию модификации прежде всего вступают 4 SH-группы на 1 моль белка, затем еще 4 и, наконец, оставшиеся 8 SH-групп. Первые 4 быстрореагирующих остатка цистеина участвуют, как было показано ранее, в формировании активного центра фермента [1, 5].

Целью данной работы явилось выделение из триптического гидролизата дегидрогеназы пептида, содержащего цистеин активного центра, и установление его структуры.

В качестве метки цистеина активного центра использовали ^{14}C -иодуксусную кислоту. Фермент, модифицированный по 4 SH-группам, был далее карбоксиметилирован по оставшимся 12 SH-группам немеченой иодуксусной кислотой. Для достижения полноты реакции по всем оставшимся SH-группам карбоксиметилирование проводили в 8 М мочеvine.

Смесь пептидов после гидролиза трипсином карбоксиметилированного белка разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,1 М бикарбонате аммония, pH 8. Было получено 7 перекрывающихся фракций (рис. 1), одна из которых (T-2) содержала наибольшее количество радиоактивности.

Таблица 1
Аминокислотный состав пептида T-2A-1

Аминокислота	Количество, мкмоль	Число остатков
S-CM-Cys	0,191	1,9(2) **
Asp	0,198	2,0(2)
Thr	0,171	1,7(2)
Ser	0,173	1,7(2)
Pro	0,100	1,0(1)
Ala	0,278	2,8(3)
Val	0,038 *	0,4(1)
Ile	0,030 *	0,3(1)
Leu	0,182	1,8(2)
Lys	0,094	0,9(1)
Общее число остатков		17

* Занижение значения для валина и изолейцина объясняется трудностью расщепления пептидных связей, образованных этими аминокислотами, за 24 ч.

** В скобках приведены величины, полученные из структуры пептида по данным секвенатора.

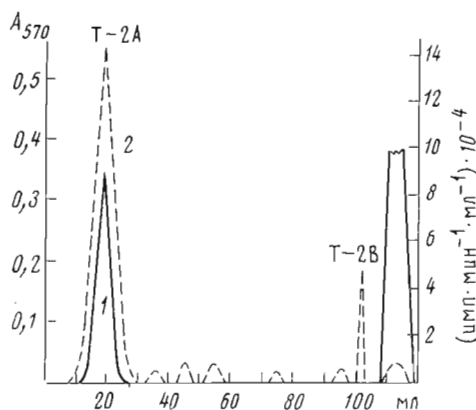


Рис. 2. Хроматография фракции Т-2 на колонке $0,9 \times 50$ см с дауэксом 50×2 (200—400 меш). Разделение пептидов проводили в градиенте концентрации пиридин-ацетата и рН. Градиент: 150 мл 0,2 М пиридин-ацетата, рН 3, — 150 мл 0,5 М пиридин-ацетата, рН 5, — 150 мл 2 М пиридин-ацетата, рН 5,5. Заканчивали элюцию 2 М пиридином, рН 11. Скорость элюции 20 мл/ч, температура 50° , объем фракции 2 мл. 1 — оптическая плотность при 570 нм, 2 — радиоактивность

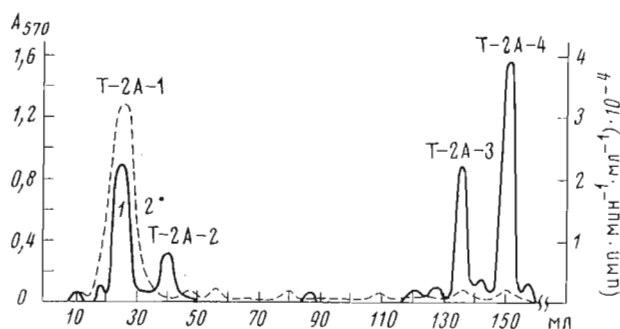


Рис. 3. Хроматография фракции Т-2А на колонке $0,9 \times 50$ см с дауэксом 1×2 (200—400 меш). Разделение пептидов проводили в градиенте: 60 мл смеси 1% пиридин-N-метилморфолин- α -пиколин-растворов, доведенной уксусной кислотой до рН 6,5, — 60 мл 1 н. уксусной кислоты, рН 2,3. Заканчивали элюцию 2 н. уксусной кислотой. Скорость элюции 20 мл/ч, температура 50° , объем фракции 2 мл. 1 — оптическая плотность при 570 нм, 2 — радиоактивность

По данным ТСХ на силикагеле и N-концевого анализа с помощью автоматического метода Эдмана, фракция Т-2 представляла собой смесь пептидов. Для разделения смеси пептидов фракцию Т-2 подвергали хроматографии на катионите дауэкс 50×2 в градиенте пиридин-ацетатных буферов (рис. 2). Был получен единственный пик (фракция Т-2А), который содержал основное количество радиоактивности и был нингидрин-положительным. Остальной пептидный материал удалось смыть с колонки лишь 2 М пиридином.

Дальнейшее разделение фракции Т-2А (см. рис. 2) проводили на анионите дауэкс 1×2 в системе буферов Шредера (рис. 3) [6]. Было получено 4 фракции, и лишь одна из них (Т-2А-1) содержала радиоактивность. Оказалось, что она представляет собой гомогенный пептид (табл. 1), причем радиоактивность содержал лишь пик S-CM-Cys.

Аминокислотную последовательность пептида Т-2А-1 определяли, используя автоматический метод Эдмана. Деградацию пептида проводили дважды. Вследствие гидрофобности С-концевой части пептида происходило его быстрое вымывание из реакционной ячейки прибора. По этой причине

Аминокислотная последовательность пептидов, содержащих цистеин активного центра дегидрогеназ, выделенных из разных источников [2]

Источник выделения	Аминокислотная последовательность
Рак	Asn-Met-Thr-Val-Val-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys
Палтус	Val-Val-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys
Человек	Ile-Ile-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys
Кролик, свинья, бык, цыпленок, барсук, обезьяна, страус, осетр, дрожжи	Ile-Val-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys
Крыса	Ile-Val-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys

удалось надежно идентифицировать лишь первые 12 аминокислот. Повторная деградация пептида, предварительно модифицированного 2,4-дисульфобензилотиоцианатом (реагентом Браунитцера), оказалась более успешной: идентифицировали фенилтиогидантоины аминокислот всех 16 циклов отщепления, используя всего лишь ~50 нмоль пептида (см. схему). Измерение радиоактивности фракций после каждого цикла отщепления показало, что из двух S-CM-Cys (циклы 7 и 11) лишь один радиоактивен (Cys, цикл 7).

Аминокислотная последовательность пептида Т-2А-1

Пептид	Аминокислотная последовательность
Т-2А-1	¹ Ile-Val-Ser-Asn- ⁵ Ala-Ser-Cys- ¹⁰ Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro- ¹⁵ Leu-Ala-Lys

Структура выделенного нами пептида Т-2А-1, содержащего цистеин активного центра фермента (табл. 2), гомологична последовательности, аминокислот аналогичных пептидов, выделенных из дегидрогеназ из других источников.

Экспериментальная часть

В работе использовали дегидрогеназу из скелетных мышц крысы, выделенную по описанному ранее методу [7].

Карбоксиметилирование белка проводили по методу, описанному в предыдущем сообщении.

Триптический гидролиз. 200 мг (1,4 мкмоль) белка в 0,5% бикарбонате аммония, рН 8,5 (20 мг/мл), термостатировали при 37° с трипсином (тип XI, обработанный дифенилкарбамилхлоридом, —Sigma, Chem. Co, Англия) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Трипсин добавляли двумя равными порциями. Вторая порция была добавлена через 3,5 ч после начала гидролиза. Всего гидролиз продолжался 7 ч. По окончании его смесь лиофилизовали.

Разделение пептидов проводили на колонках методами гель- и ионообменной хроматографии. Условия разделения пептидов — на рис. 1—3.

Методы анализа фракций. Радиоактивность фракций измеряли на установке Mark II (Nuclear Chicago, США), отбирая аликвоты исследуемого раствора по 0,1 мл. Использовали жидкий сцинтиллятор ЖС-8 с 10% добавкой этилового спирта. Щелочной гидролиз пептидов и последующую реакцию с нингидрином осуществляли по методу Хирса [8], отбирая аликвоты (0,2 мл) из каждой фракции.

Проверка однородности пептидов. Для проверки однородности пептидов использовали ТСХ на пластинках 5×20 см с тонким слоем целлюлозы (Ватман № 300) в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 15 : 3 : 12), а также электрофорез на бумаге (Ватман 3 ММ) в буферах pH 1,9 (7% HCOOH), pH 3,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 10 : 89) и pH 6,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 10 : 89). Пептиды обнаруживали после обработки хроматограммы или электрофореграммы 0,4% раствором нингидрина в ацетоне.

Определение N-концевых аминокислот и аминокислотной последовательности. В работе использовали секвенатор фирмы Beckman (США), модель 890, с реакционной ячейкой, модифицированной по типу модели 890 С, работающий по стандартным белково-пептидной программе с диметилбензил-амином и белковой программе с 0,2 М «квадролом». Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот проводили на газовом хроматографе, модель 45 (Beckman, США), на колонках, заполненных носителем хромосорб W-HP (100—200 меш) с нанесенной на него жидкой силиконовой фазой SP-400 [9], а также с помощью ТСХ на пластинках 20×20 см с закрепленным слоем силикагеля (Merck, ФРГ). В некоторых случаях использовали кислотный гидролиз фенилтиогидантоинов аминокислот до исходных аминокислот и последующий аминокислотный анализ на анализаторе, модель 3201 (ЛКВ, Швеция).

Модификация пептида T-2A-1 2,4-дисульфобенлизотиоцианатом. К 0,05 мкмоль пептида добавляли 1,5 мкмоль 2,4-дисульфобенлизотиоцианата, растворенного в 0,6 мл смеси диметилаллиламин — вода (1 : 1). Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 50°, а затем вносили в реакционный стакан секвенатора [10].

После высушивания проводили 20 минутную промывку *n*-хлорбутаном для удаления избытка реагента и побочных продуктов реакции и затем после высушивания осуществляли обычный цикл расщепления по Эдману.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harris J. I., Meriwether B. P., Park J. K. (1963) Nature, 198, 154—156.
2. Perham R. N. (1969) Biochem. J., 111, 17—21.
3. Наградова Н. К., Гусева М. К., Муронец В. И., Прасолова И. Д. (1973) Биохимия, 38, 143—155.
4. Nagradova N. K., Muronetz V. I., Grozdova I. D., Golovina T. O. (1975) Biochim. et biophys. acta, 377, 15—25.
5. Perham R. N., Harris J. I. (1963) J. Mol. Biol., 7, 316—320.
6. Schroeder W. A. (1967) Methods Enzymol., 11, 361—369.
7. Наградова Н. К., Гусева М. К. (1974) Биохимия, 36, 588—594.
8. Hirs C. H. W. (1967) Methods Enzymol., 11, 325—329.
9. Pisano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B., Jr. (1972) Anal. Biochem., 45, 43—59.
10. Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A. (1971) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 352, 1730—1733.

Поступила в редакцию
27.X.1976

PEPTIDE SEQUENCE CONTAINING THE ACTIVE-SITE CYSTEINE OF *D*-GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM RAT SKELETAL MUSCLES

БАЙБАКОВ В. А., ЗHELTOVA A. O., BELYANOVA L. P.,
BARATOVA L. A., VOSPELNIKOVA N. D., SAFRONOVA M. I.

*A. N. Belozersky Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular
Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

From tryptic hydrolysate of *D*-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rat skeletal muscles, the 17-membered peptide containing cysteine of the active centre was isolated and its amino acid sequence was determined: Ile-Val-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Leu-Ala-Lys. The peptide sequence is homologous to those of similar peptides isolated from *D*-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from other sources.