



УДК 547.962.04

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ,
ОБРАЗОВАННЫХ ОСТАТКАМИ ДИАМИНОПРОПИОНОВОЙ
И N-β-МЕТИЛДИАМИНОПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТ

*Азаева С. М., Баратова Л. А., Белянова Л. П.,
Курилова С. А., Лебедева З. И., Назарова Т. И.*

*Межфакультетская проблемная лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Предложен метод специфического расщепления пептидных связей, образованных карбоксильной группой α, β-диаминокислот. Фенилизотиоцианат в условиях реакции Эдмана реагирует с β-аминогруппой с образованием фенилтиокарбамильного производного, превращающегося в производное гидропримидина. Сравнение скоростей циклизации фенилтиокарбамильных производных α-аланина, β-аланина и N-метил-β-аланина показывает, что шестичленный цикл образуется несколько медленнее пятичленного, а введение метильной группы к атому азота облегчает циклизацию. Предложенный метод использовал для расщепления пептидных связей в вимонцине, а также в глутатине и неорганической пирофосфатазе после их модификации метиламином.

Большую ценность при изучении первичной структуры белков представляют методы, дающие ограниченное число пептидов, так как использование секвенатора открывает широкие возможности для непосредственного установления их структуры. В связи с этим большой интерес вызывает поиск методов расщепления по остаткам редко встречающихся аминокислот. К таким остаткам относятся аминокислоты, образующиеся в результате избирательной химической модификации белков. Так, при взаимодействии остатков фосфoserина, цистина и O-гликозидных производных серина или треонина с щелочным раствором метиламина в белках обнаруживаются остатки N-β-метилдиаминопропионовой кислоты (N-β-CH₃DAP) [1—4], а перегруппировка гидроксамата функционально важного остатка аспарагиновой кислоты приводит к появлению в полипептидной цепи остатка α,β-диаминопропионовой кислоты [5—8]. Ранее нами была показана принципиальная возможность расщепления полипептидной цепи по остаткам этих аминокислот реакцией с фенилизотиоцианатом в условиях деградации по Эдману [9, 10]. Настоящая работа посвящена более детальному рассмотрению этого метода.

Для проверки возможности образования шестичленного цикла в качестве простейшей модели был выбран β-аланин. Реакцию Эдмана проводили по методике, обычно применяемой для синтеза фенилтиогидантоинов [11]. Полученное соединение оказалось нейтральным в условиях электрофореза, отличалось по подвижности в хроматографических системах от исходного фенилтиокарбамильного производного и имело УФ-спектр, похожий на спектры, описанные для фенилтиогидантоинов α-аминокислот

Таблица 1

Характеристики соединений, полученных в условиях реакции Эдмана:
1 — из β-аланина, 2 — из саркозина, 3 — из N-метил-β-аланина, 4 — из α-аланина

№ п.п.	Соединение	R_f в системе гентан — n-бутанол, 9:6	УФ-спектры		
			$\lambda_{\text{макс}}$, $\epsilon_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$, $\epsilon_{\text{мин}}$	$\epsilon_{\text{мин}}/\epsilon_{\text{макс}}$
1	2-Тιο-3-фенилтетрагидропиримидинон-4	0,177	275, 10 500	253, 6600	0,63
2	1-Метил-2-тио-3-фенилгидантоин	0,21	269	245	—
3	1-Метил-2-тио-3-фенилтетрагидропиримидинон-4	0,16	275, 12 400	253, 6600	0,54
4	Фенилтиогидантоин аланина *	0,63	269 *, 16 000 *	245 *, 6300 *	0,39 *

* Литературные данные [11].

Таблица 2

Константы скорости циклизации фенилтиокарбамильных производных

Фенилтиокарбамильное производное	Константа скорости, мин ⁻¹	Фенилтиокарбамильное производное	Константа скорости, мин ⁻¹
α-Аланина	$1,1 \cdot 10^{-2}$	γGlu-NβCH ₃ DAP-Gly	$8,1 \cdot 10^{-2}$
β-Аланина	$2,2 \cdot 10^{-3}$	CM-γGlu-NβCH ₃ DAP-Gly	$8,2 \cdot 10^{-2}$
N-Метил-β-аланина	$1,3 \cdot 10^{-2}$	Виноцидина	$8,0 \cdot 10^{-3}$

[11]. На основании полученных данных (табл. 1) соединение идентифицировали как 2-тио-3-фенилтетрагидропиримидинон-4 и был сделан вывод, что соединения с аминогруппой в β-положении способны вступать в реакцию Эдмана с образованием циклических производных.

Влияние метилирования аминогруппы было проверено на примере саркозина. Синтез его фенилтиокарбамильного производного и замыкание цикла проводили так же, как и в случае β-аланина. Было установлено, что в этих условиях легко образуется 1-метил-2-тио-3-фенилтиогидантоин.

Далее была изучена реакция с фенилизотиоцианатом N-метил-β-аланина, содержащего метилированную аминогруппу в β-положении. При взаимодействии с фенилизотиоцианатом это соединение образует 1-метил-2-тио-3-фенилтетрагидропиримидинон-4.

Максимум оптического поглощения шестичленных циклов равен 275 нм, а минимум — 253 нм, в то время как все фенилтиогидантоины имеют максимум оптического поглощения при 269 нм и минимум при 245 нм (табл. 1). УФ-спектры шестичленных циклов показывают, что введение дополнительного метиленового звена в цикл вызывает bathochromic сдвиг характерных частот спектров [9]. Кроме того, коэффициенты молярной экстинкции для фенилтиогидантоинов в максимуме поглощения несколько выше, чем для замещенных гидропиримидинов, а в минимуме они сохраняются, что приводит к некоторому завышению отношения $\epsilon_{\text{мин}}/\epsilon_{\text{макс}}$ по сравнению с фенилтиогидантоинами (см. табл. 1).

Далее необходимо было сопоставить скорости образования пяти- и шестичленных циклов, а также оценить влияние метилированной аминогруппы на скорость замыкания шестичленного цикла.

Для этого сравнивали скорости превращения фенилтиокарбамильных производных α-аланина, β-аланина и N-метил-β-аланина при 50° в 1 н. HCl. За ходом реакции следили по убыли поглощения при 253 нм для

фенилтиокарбамильных производных β -аланина и N-метил- β -аминопропионовой кислоты и при 245 нм для производного α -аланина.

Сравнение констант скорости циклизации (табл. 2) показывает, что фенилтиокарбамильное производное β -аланина циклизуется сравнительно медленно, однако присутствие в β -положении метилированной аминогруппы приводит к ускорению реакции циклизации соответствующего фенилтиокарбамильного производного в 5 раз и делает ее сравнимой со скоростью образования фенилтиогидантоина α -аланина.

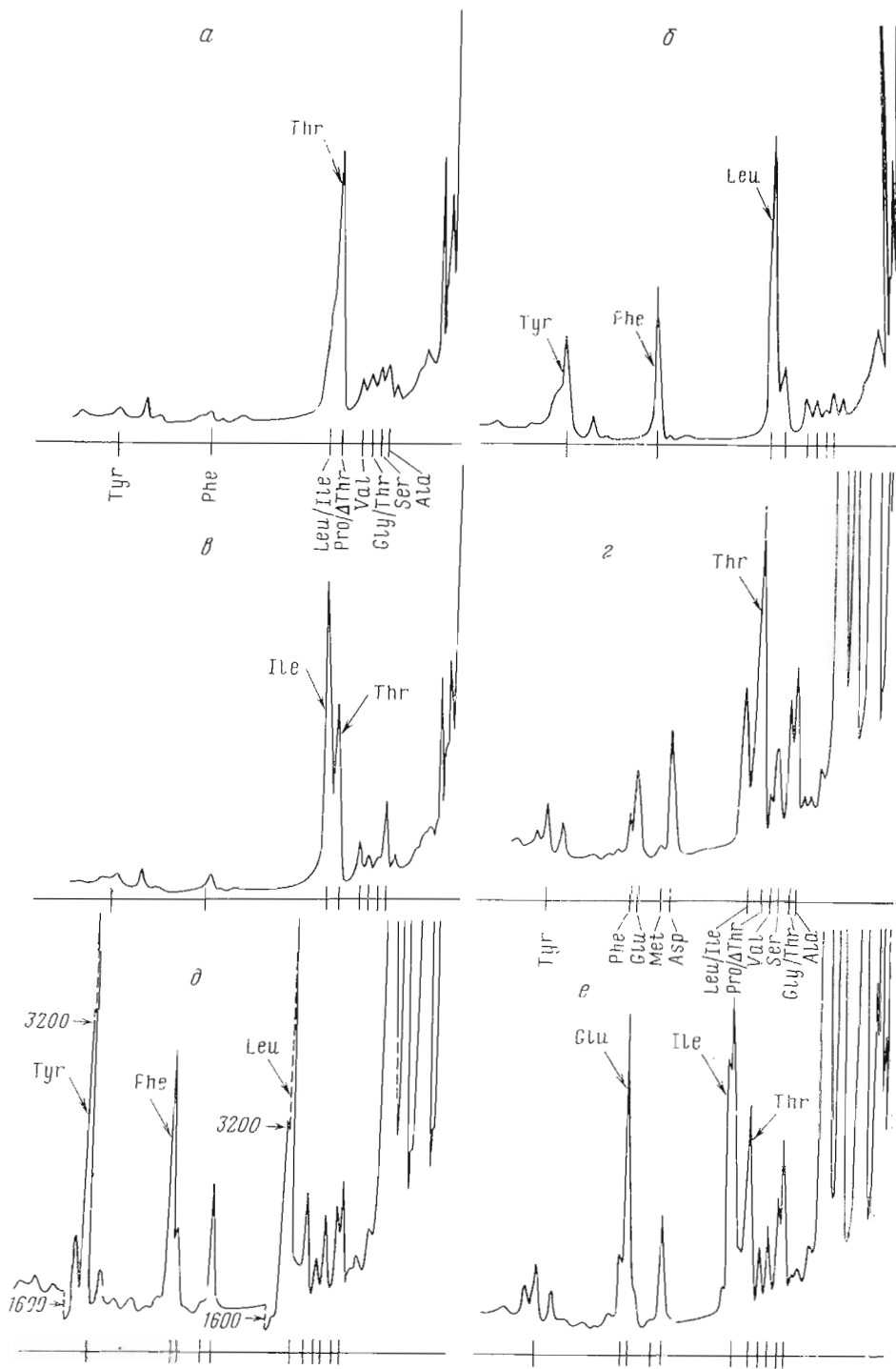
Далее была изучена возможность расщепления пептидной связи с помощью реакции Эдмана по остаткам α, β -диаминопропионовой кислоты и N- β -метилдиаминопропионовой кислоты. В качестве модельных соединений были выбраны трипептид γ GluN- β CH₃DAPGly и антибиотик виомицин. Исходными соединениями для получения трипептида служили окисленный и восстановленный глутатион.

Так как остаток цистина в белках легко реагирует со щелочным раствором метиламина, образуя 1 моль N- β -метилдиаминопропионовой кислоты [2], окисленный глутатион обрабатывали 1 M раствором метиламина в 0,25 н. растворе гидроокиси натрия при 37° в течение 4 ч. Как показали результаты аминокислотного анализа, за это время реакция полностью заканчивается, и на одну молекулу окисленного глутатиона приходится 1 моль N- β -метилдиаминопропионовой кислоты. Восстановленный глутатион предварительно карбоксиамидометилировали иодоацетамидом в присутствии меркаптоэтанола и получили дикарбоксиамидометилглутатион. За реакцией дикарбоксиамидометилглутатиона с метиламином следили во времени, так как кинетика образования диаминопропионовой кислоты из SM-цистеина ранее изучена не была. Оказалось, что в данном случае реакция протекает сравнительно медленно и за 6 ч проходит на 75%.

Эти результаты показали вероятность образования N- β -метилдиаминопропионовой кислоты из SM-цистеина и сделали возможным применение реакции Эдмана для специфического расщепления полипептидной цепи по остаткам цистеина после предварительного карбоксиметилирования и реакции с метиламином.

Оба пептида обработали фенилизотиоцианатом при pH 9 в течение 1 ч при 40° и полученное фенилтиокарбамильное производное инкубировали при 40° со смесью ледяной уксусной и концентрированной соляной кислот. За расщеплением следили по реакции с нингидрином. В первый момент времени проба на нингидрин была отрицательной, однако в ходе реакции количество нингидринположительного вещества постепенно росло. Это вызвано тем, что в ходе реакции происходит разрыв пептидной связи с освобождением глицина, что было показано электрофоретическим и хроматографическим исследованием. Количество последнего было рассчитано по соответствующей калибровочной прямой.

Для исследования расщепления пептидных связей методом Эдмана по остаткам α, β -диаминопропионовой кислоты или ее аналогов был выбран антибиотик виомицин, имеющий на N-конце β -лизин [12] и способный реагировать с фенилизотиоцианатом с образованием фенилтиокарбамильного производного. Для проверки возможности замыкания шестичленного цикла с одновременным разрывом пептидной связи фенилтиокарбамильное производное антибиотика обрабатывали кислотой. Электрофоретический анализ реакционной смеси показал, что в ее состав входит исходное фенилтиокарбамильное производное антибиотика, вещество, соответствующее его циклической части, и вещество, соответствующее образующемуся гидроциримидину. За ходом расщепления следили по реакции с нингидрином. Исходное фенилтиокарбамильное производное виомицина не содержало нингидринположительного вещества, но в ходе реакции наблюдалось накопление соединения со свободной аминогруппой, что свидетельствовало о расщеплении пептидной связи антибиотика в условиях реакции Эдмана.



Анализ фенилтиогидантоинов (a — e) и триметилсилильных производных фенилтиогидантоинов (z — e) аминокислот, получающихся в ходе расщепления по Эдману неорганической пирофосфатазы дрожжей, модифицированной метиламином

Из сопоставления скоростей расщепления пептидных связей, образованных аминокислотами, содержащими в β -положении аминокислотную или метилированную аминокислотную группу, вытекает, что присутствие метилированной β -аминокислотной группы значительно облегчает процесс (см. табл. 2).

Предлагаемый метод специфического расщепления пептидных связей может найти широкое применение для расщепления белков на большие фрагменты, так как число остатков диаминопропионовой или N - β -метилдиаминопропионовой кислоты после модификации белков обычно бывает невелико. Наиболее привлекательным кажется проведение реакции расщепления модифицированного белка прямо в секвенаторе, что позволяет непосредственно устанавливать последовательность, следующую за модифицированным остатком.

Применимость этого метода для специфического расщепления белков была продемонстрирована на примере неорганической пирофосфатазы из дрожжей. Ранее на основании реакции с метиламином было сделано предположение, что две идентичные субъединицы этого белка содержат по два гликозилированных остатка серина [13]. Существовало, что в белке нет ни остатков цистина, ни остатков фосфосерина.

Белок обрабатывали в течение 6 ч растворами метиламина и щелочи, отделяли от избытка реагентов и определяли N -концевую последовательность предполагаемых фрагментов белка на секвенаторе. Опыт был повторен трижды и дал воспроизводимые результаты. Во всех случаях, кроме N -концевой последовательности (Thr-Tyr-Thr-), начиная со второго шага, обнаруживаются дополнительно фенилтиогидантоины еще двух аминокислот: лейцина и фенилаланина на втором шаге, глутаминовой кислоты и изолейцина — на третьем, тирозина и аспарагина — на четвертом и т. д.

Тщательное сопоставление хроматограмм, полученных при анализе фенилтиогидантоинов аминокислот первых трех циклов отщепления (рисунок), позволяет четко проследить две дополнительные последовательности аминокислот наряду с уже известной N -концевой последовательностью белка [14]. Не исключено, что более тонкий подбор условий реакции позволит снизить содержание дополнительных пиков аминокислот.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) в условиях стандартного определения аминокислотной последовательности происходит расщепление пептидных связей, образованных N - β -метилдиаминопропионовой кислотой; 2) присутствие на первом шаге только N -концевой аминокислоты доказывает направленность модификации; 3) появление со второго шага двух новых аминокислот подтверждает, что число гликозилированных остатков серина в пирофосфатазе составляет четыре остатка на моль белка.

Можно думать, что локализация этих остатков в полипептидной цепи станет возможной после установления первичной структуры неорганической пирофосфатазы.

Экспериментальная часть

В работе использовали фенилизотиоцианат (Merck, ФРГ), α -аланин, β -аланин, глицин, окисленный и восстановленный глутатион (Reanal, Венгрия), саркозин (Veb Berlin Chemie, ГДР). Хроматографически чистый препарат антибиотика виомицина был любезно предоставлен Г. С. Катрухой (химический факультет МГУ). Неорганическая пирофосфатаза дрожжей была выделена по методу Брага и др. [15] и имела удельную активность 970 Е/мг.

Синтез бромгидрата N -метил- β -аланина проводили согласно Кокеру и Лапворсу [16]. Фенилтиокарбамильные производные β -аланина, саркозина, N - β -метилаланина и соответствующие циклические производные получали по методике, описанной для α -аминокислот [14]. Таким образом, были получены следующие соединения: 2-тио-3-фенилтетрагидропири-

мидинон-4 (выход 49,5%, т. пл. 164—167°. Найдено, %: С 57,10; Н 5,06. $C_{10}H_{10}N_2OS$. Вычислено, %: С 58,22; Н 4,88), 1-метил-2-тио-3-фенилгидантоин саркозина (выход 89%, т. пл. 160—161°), 1-метил-2-тио-3-фенилтетрагидропиримидинон-4 (выход 61%, т. пл. 144—145°. Найдено, %: С 59,84; Н 5,59. $C_{11}H_{12}N_2OS$. Вычислено, %: С 59,97; Н 5,49). Синтез дикарбоксиамидометилглутатиона проводили из восстановленного глутатиона и подацетамида при рН 8,5 и 37° в течение 2 ч и вещество выделяли на дауэксе-1 в H^+ -форме. Часть полученного соединения гидролизovali в течение 24 ч соляной кислотой при 105° и полноту реакции подтверждали результатами аминокислотного анализа.

Модификацию окисленного глутатиона, дикарбоксиамидометилглутатиона и неорганической пирофосфатазы метиламином осуществляли по методике Колесниковой и др. [2] 1 М метиламином и 0,25 н. щелочью при 37° в течение 4 ч (в случае пирофосфатазы — 6 ч).

Фенилтиокарбамильные производные пептидов синтезировали по методике Эдмана [17].

Изучение кинетики образования циклов из фенилтиокарбамильных производных аланина, β -аланина и N-метил- β -аланина. 5 мг фенилтиокарбамильного производного α -аланина или N-метил- β -аланина в 10 мл 1 н. HCl инкубировали при 50°, отбирая пробы через определенные промежутки времени в течение 0—30 мин, и измеряли оптическое поглощение спиртового раствора при 253 нм.

В случае фенилтиокарбамильного производного β -аланина пробы, отобраные в течение 0—150 мин, предварительно подвергали электрофорезу при рН 5,6 в течение 1 ч при 2000 В и измеряли оптическое поглощение фенилтиокарбамильного производного после элюции спиртом.

Изучение кинетики расщепления пептидов по остаткам N- β -метилдiamiнопропионой кислоты. Циклизацию фенилтиокарбамильных производных проводили по методике Эдмана [18]. С этой целью фенилтиокарбамильное производное растворяли в смеси ледяной и концентрированной соляной кислот (5 : 1) и инкубировали при 40°, отбирая пробы через определенные промежутки времени в течение 0—35 мин. За ходом реакции следили по количеству выпреципировавшегося глицина, которое определяли реакцией с нингидридом.

Расщепление модифицированной неорганической пирофосфатазы. N-Концевую последовательность неорганической пирофосфатазы, модифицированной метиламином, определяли в секвенаторе (Beckman, ФРГ, модель 890), реакционная ячейка которой была модифицирована по типу модели 890С. Анализ проводили по «квадрольной» программе (программа D-XI). Для экстракции тиозолинонов использовали 1-хлорбутан, содержащий 10^{-4} М дитиотреит. Тиозолиноны, освобождающиеся после каждого цикла деградации, превращали в соответствующие тиогидантоины обработкой 1 н. HCl при 80° в течение 10 мин. Фенилтиогидантоины аминокислот и их триметилсилильные производные анализировали на газовом хроматографе GC-45 (Beckman, ФРГ). При анализе отбирали 8% от общего количества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесникова В. Ю., Склянкина В. А., Аваева С. М. (1973) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», 3, 380—381.
2. Колесникова В. Ю., Склянкина В. А., Баратова Л. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1974) Биохимия, 39, 287—293.
3. Лебедева З. И., Аваева С. М. (1975) Биоорг. химия, 1, 416—418.
4. Лебедева З. И., Баратова Л. А., Аваева С. М., Медведева И. В., Мирзаянова М. Н., Хорлин А. Я. (1975) Биоорг. химия, 1, 923—927.
5. Suzuki F., Fukunishi K., Takeda G. (1969) J. Biochem., 66, 767—774.
6. Suzuki F. (1971) Biochemistry, 10, 2707—2710.
7. Brevet A., Kaustau C., Desvages G., Pradel L. A., Thoai N. (1973) Eur. J. Biochem., 39, 141—147.

8. Erlanger B. F., Vratsanos S. M., Wasserman N. H., Cooper A. G. (1966) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **23**, 243—247.
9. Назарова Т. И., Курилова С. А., Аваева С. М. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 1580—1582.
10. Аваева С. М., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Курилова С. А., Лебедева З. И., Назарова Т. И. (1976) Тезисы Советско-американского симпозиума по химии и физике белка, с. 58.
11. Edman P. (1970) in *Protein Sequence Determination* (S. B. Needleman, ed.), pp. 211—248, Springer-Verlag, N. Y.
12. Bucroff B. W., Cameron D., Croft L. K., Hassanali-Walji A., Johnson A. W., Webb T. (1971) *Experientia*, **27**, 501—503.
13. Лебедева З. И., Аваева С. М. (1976) *Биоорг. химия*, **1**, 416—418.
14. Baratova L. A., Lebedeva Z. I., Belyanova L. P., Awaeva S. M. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **59**, 653—657.
15. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 344—351.
16. Cocker W., Lapworth A. (1931) *J. Chem. Soc.*, 1894—1898.
17. Edman P. (1950) *Acta chem. scand.*, **4**, 277—283.

Поступила в редакцию
18.I.1977

CLEAVAGE OF PEPTIDE BONDS FORMED BY DIAMINOPROPIONIC AND N- β -METHYLDIAMINOPROPIONIC ACID RESIDUES

AWAEVA S. M., BARATOVA L. A., BELYANOVA L. P.,
KURILOVA S. A., LEBEDEVA Z. I., NAZAROVA T. I.

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

A method was proposed for specific cleavage of the peptide bonds involving carboxylic groups of α,β -diamino acids. Under conditions of Edman degradation, phenylisothiocyanate reacts with β -amino group yielding a phenylthiocarbamoyl derivative which is converted into a hydroxypyrimidine one. The comparison of the cyclization rates for the phenylthiocarbamoyl derivatives of α -alanine, β -alanine and N-methyl- β -alanine shows that a six-membered cycle is formed somewhat slower than a five-membered one and that methyl group attachment to the nitrogen atom facilitates cyclization. The proposed method was used to cleave peptide bonds in viomycine as well as in glutathione and inorganic pyrophosphatase after their modification with methylamine.