



УДК 547. 96

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА α -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*II. ПЕПТИДЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ ПРОТЕАЗОЙ
ИЗ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* *

Дипкин В. М., Модянов П. П., Смирнов Ю. В.,
Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В.,
Потапенко Н. А.

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

Проведен гидролиз карбоксиметилированного препарата α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* протеазой из *Staphylococcus aureus*. Образовавшиеся пептиды разделены хроматографией на катионите Аминекс 50W \times 2 и очищены с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге и гель-фильтрации. Определена аминокислотная последовательность выделенных пептидов, которые в сумме содержат 285 аминокислотных остатков из 329, входящих в состав α -субъединицы.

Исследование структуры триптических пептидов [1] показало, что в молекуле α -субъединицы содержится более 30 остатков глутаминовой кислоты, причем только 6 из них расположены рядом с остатками лизина или аргинина. На основании этих данных было признано целесообразным в качестве следующего этапа изучения первичной структуры α -субъединицы (для объединения триптических фрагментов в более крупные блоки) осуществить гидролиз белка протеазой из *Staphylococcus aureus* (далее стафилококковая протеаза). Этот фермент гидролизует в основном связи, образованные α -карбоксильными группами остатков глутаминовых кислот [2].

Гидролиз карбоксиметилированной α -субъединицы стафилококковой протеазой проводился в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8,2) при соотношении фермент — субстрат 1 : 30. Прекращение гидролиза достигалось замораживанием и последующей лиофилизацией гидролизата.

Для первоначального фракционирования образовавшейся смеси пептидов использовалась хроматография на катионите Аминекс 50W \times 2, поскольку в данном случае предполагалось наличие более высокомолекулярных пептидов, чем в случае триптического гидролиза [1]. Поскольку исходя из специфичности стафилококковой протеазы ожидалось образование большого числа кислых пептидов, для улучшения их разделения в систему элюирующих буферов [1] был введен дополнительный компонент

* Сообщение 1 см. [1].

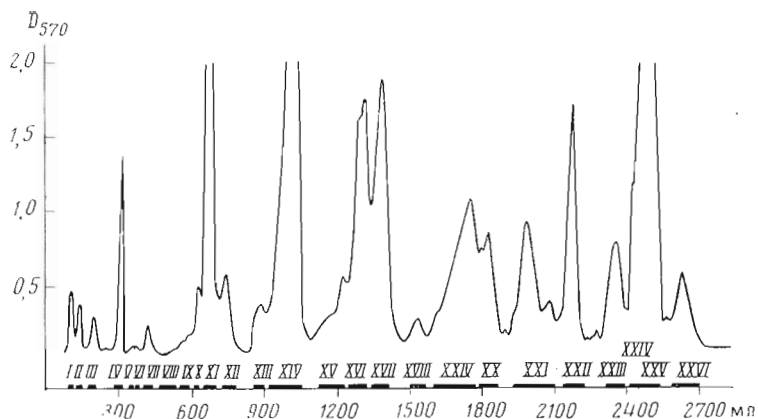


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных при гидролизе α -субъединицы стафилококковой протезазой, на катионите Аминекс 50W \times 2. Черные прямоугольники на оси абсцисс — границы объединения фракций

—0,2 М пиридин-ацетатный буфер, pH 4,2. В результате хроматографирования гидролизата на катионите было получено 26 объединенных фракций (рис. 1).

Анализ состава объединенных фракций с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы и определение их N-концевых аминокислотных остатков показали, что все фракции представляют собой смеси небольшого числа пептидов. При этом было обнаружено, что в состав фракций I, V, IX, XII, XVIII, XIX и XXII—XXIV входят пептиды, не образующие четких зон при хроматографии на целлюлозе; поэтому для выделения пептидов из указанных фракций использовалась гель-фильтрация на сефадексах G-50 и G-25. При концентрировании фракции IX образовался осадок, который был отделен центрифугированием. После дополнительной очистки этого осадка, растворенного в водном аммиаке при pH 10,5, был получен чистый пептид Sp-IX-1-1. Выделение пептидов из растворимой части фракции IX осуществлялось с помощью хроматографии на бумаге. Большинство пептидов из остальных фракций было выделено в гомогенном состоянии путем однократного хроматографирования на бумаге. Как показал анализ N-концевых аминокислотных остатков, фракции VIII-1, XVI-2 и XXVI-2 не являлись чистыми пептидами; дальнейшее деление и очистка этих фракций проводились с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге.

Исчерпывающие данные о распределении пептидов по фракциям и их аминокислотный состав приведены в табл. 1. Как видно из этой таблицы, в ряде случаев пептиды с одинаковым аминокислотным составом были выделены из различных объединенных фракций. В большинстве случаев идентичность пептидов легко объясняется неполным разделением при ионообменной хроматографии. Пептиды Sp-VIII-1-1 и Sp-XVI-2-1 с одинаковым аминокислотным составом были выделены из далеко отстоящих друг от друга фракций. В этих пептидах отсутствуют свободные α -аминогруппы, что связано с циклизацией N-концевого остатка глутамина в пироглутаминовую кислоту. Часть пептида с образовавшимся в процессе гидролиза остатком пироглутаминовой кислоты элюировалась с катионита во фракции VIII, а циклизация остатка глутамина в пептиде Sp-XVI-2-1 произошла при хранении фракции XVI. Разделение идентичных пептидов Sp-XX-3 и Sp-XX-4 при хроматографировании на бумаге обусловлено разной степенью окисления присутствующего в их составе остатка метионина.

Всего из гидролизата α -субъединицы стафилококковой протезазой был выделен 41 пептид. Соединение Sp-III-1 оказалось свободной глутаминовой кислотой (выход 24%), образовавшейся при гидролизе связи Glu-

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе КМ α -субъединицы стафилококковой протеазой

Аминокислота	Пептиды *									
	Sp-I-1	Sp-II-2	Sp-II-4	Sp-III-1	Sp-III-3	Sp-IV-3	Sp-IV-4	Sp-IV-5		
СмCys										
Asp	4,98 (2)	1,84 (2)	0,89 (1)		1,04 (1)	1,06 (1)	0,53 (1)	1,11 (1)		
Thr	1,80 (2)	1,82 (2)	0,99 (1)			0,94 (1)				
Ser			0,96 (1)			0,99 (2)	4,18 (1)			
Glu	2,83 (3)	2,38 (2)	1,11 (1)	1,00 (1)	3,01 (3)	1,99 (2)	4,22 (1)	0,91 (1)		
Pro	4,02 (1)	0,97 (1)	0,98 (1)				0,88 (1)			
Gly	0,99 (1)	1,15 (1)	1,42 (1)		1,05 (1)	1,07 (1)				
Ala			1,05 (1)		1,05 (1)	0,94 (1)	0,82 (1)			
Val			0,98 (1)			0,69 (1)	0,98 (1)			
Met	0,72 (1)	0,67 (1)	0,91 (1)							
Ile	0,92 (1)	0,85 (1)			0,94 (1)			0,96 (1)		
Leu					0,91 (1)			1,02 (1)		
Tyr										
Phe										
His										
Lys										
Arg										
Trp										
Число остатков	11	10	9	1	8	7	7	4		
N-Концевая аминокислота	Met	Met	Ser	Glu	Gly	Met	Ala	Asp		
Выход, %	28	4	23	24	19	18	5	8		

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды									
	Sp-V-1	Sp-VI-3	Sp-VII-1	Sp-VII-2	Sp-VII-3	Sp-VIII-1-1; Sp-XVI-2-1	Sp-VIII-1-2	Sp-IX-1-1		
СmCys				2,00(2)	1,14(1)		4,13(1)	3,95(4)		
Asp			0,79(1)			1,97(2)		2,61(3)		
Thr			1,02(1)			1,99(2)		4,22(1)		
Ser			1,08(1)	0,94(1)		3,33(3)	1,89(2)	1,19(1)		
Glu	4,09(1)	4,28(1)		1,20(1)		1,00(1)		1,09(1)		
Pro				1,93(2)				2,95(3)		
Gly							1,23(1)	1,93(2)		
Ala			1,96(2)	1,93(2)	1,08(1)	1,07(1)		1,93(2)		
Val	0,81(1)	0,78(1)			0,86(1)	1,84(2)	1,79(2)	2,83(3) **		
Met										
Ile				1,02(1)		1,92(2)	0,66(1)	2,81(3) **		
Leu			0,96(1)				0,90(1)	2,03(2)		
Tyr										
Phe					0,88(1)					
His										
Lys			0,99(1)			0,93(1)	0,99(1)	0,85(1)		
Arg						0,96(1)		0,90(1)		
Trp										
Число остатков	2	2	7	10	4	15	9	25		
N-Концевая аминокислота	Val	Met	Ala	Asn	Ala	-	Val	Val		
Выход, %	80	8	38	40	5	5	3	16		

Число остатков

N-Концевая

аминокислота

Выход, %

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептиды									
	Sp-IX-2-1	Sp-IX-2-2	Sp-X-1; Sp-IX-2-3	Sp-XI-1	Sp-XII-1	Sp-XIII-1	Sp-XIV-1	Sp-XIV-2	Sp-XIV-3	
СmCys										
Asp		4,00(1)	3,12(3)	4,16(1)	0,65(1) 2,16(2)				1,01(1)	
Thr										
Ser										
Glu	2,10(2)	4,12(1)	1,40(1)	1,03(1)	0,99(1)	1,22(1)	3,23(3)	1,20(1)	2,20(2)	
Pro	0,96(1)		2,06(2)		1,79(2)		4,01(1)			
Gly		1,00(1)			1,03(1)					
Ala					1,05(1)			2,02(2)		
Val		1,00(1)	1,01(1)	0,63(1)	1,68(2)	0,88(1)	0,88(1)	0,98(1)	0,99(1)	
Met										
Ile		0,99(1)	0,87(1)	0,94(1)	1,01(1)					
Leu		0,99(1)	2,87(3)	1,94(2)	2,01(2)					0,92(1)
Tyr					0,68(1)					
Phe			0,84(1)							
His										
Lys	0,94(1)	0,75(1)	0,95(1)	0,87(1)	1,68(2)	0,90(1)	4,87(2)	0,86(1)	0,88(1)	
Arg										
Число остатков	4	7	13	7	18	3	7	5	6	
N-Концевая аминокислота	Glu	Ile	Phe	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	
Выход, %	8	40	34	47	8	3	7	9	12	

Таблица 1 (продолжение)

АМИНОКИСЛОТА	Пептиды									
	Sp-XVI-1	Sp-XVII-1; Sp-XVI-2-2	Sp-XVII-2	Sp-XVIII-2	Sp-XIX-1; Sp-XVIII-1	Sp-XIX-2	Sp-XX-2	Sp-XX-3; Sp-XX-4	Sp-XXI-1	
CmCys										
Asp	0,98(1)	2,07(2)	1,03(1)	4,08(1)	0,62(1)	1,07(1)	1,79(2)		1,02(1)	
Thr	0,96(1)		1,06(1)	1,02(1)	1,05(1)		2,31(2)		1,93(2)	
Ser	1,13(1)	2,20(2)		2,23(2)	1,17(1)		1,03(1)		0,99(1)	
Glu		1,03(1)			0,99(1)			1,23(1)		
Pro								1,33(1)		
Gly		0,96(1)		1,81(2)	1,05(1)	1,05(1)	1,07(1)		0,93(1)	
Ala		1,96(2)	1,01(1)	1,05(1)		1,00(1)	1,04(1)			
Val					1,81(2) **			0,80(1)		
Met										
Ile		0,97(1)			1,79(2) **	1,75(2)	1,89(2)	1,72(2)	0,93(1)	
Leu	0,92(1)		0,91(1)		1,08(1)	0,91(1)				
Tyr										
Phe		1,01(1)								
His						0,75(1)	0,93(1)			
Lys	1,00(1)	1,79(2)			1,57(2)		0,94(1)			
Arg			0,88(1)	1,82(2)	0,90(1)			1,05(1)	1,65(2)	
Число остатков	5	12	5	9	14	7	11	6	8	
N-Концевая аминокислота	Tyr	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Thr	Leu	Leu	
Выход, %	40	5	12	3	35	36	2	4	7	

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	Пептиды							
	Sp-XXI-2	Sp-XXII-1	Sp-XXIII-1; Sp-XXIV-1	Sp-XXIV-2	Sp-XXV-1	Sp-XXV-2	Sp-XXVI-1	Sp-XXVI-2-1
СмCys								
Asp	4,02 (1)	4,05 (1)	1,03 (1)	1,96 (2)	4,20 (1)	4,03 (1)	1,09 (1)	0,94 (1)
Thr	1,73 (2)				1,81 (2)			
Ser					1,07 (1)			
Glu					4,22 (1)			
Pro					0,97 (1)			
Gly	4,45 (1)				4,29 (1)			
Ala	0,93 (1)	4,05 (1)	3,90 (4)	2,36 (2)				
Val	1,05 (1)	1,01 (1)		1,22 (1)				
Met				1,68 (2)				
Ile	0,68 (1)	0,89 (1)	4,92 (2)	1,04 (1)				
Leu	1,83 (2)		2,08 (2)	4,10 (4)	3,94 (4)			
Tyr		0,93 (1)						
Phe								
His								
Lys	4,06 (1)							
Arg	0,94 (1)	0,97 (1)	4,85 (2)	1,26 (1)				
Число остатков	11	7	14	17	14	10	17	11
N-Концевая аминокислота	Ile	Arg	Ala	Ile	Leu	Phe	Ile	Ala
Выход, %	11	36	16	6	31	35	17	41

* Примеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.

** Результаты гидролиза в течение 72 ч.

*** Триптофан определен качественно цветной реакцией с реактивом Эрлиха.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при гидролизе α-субъединицы стафилококковой протеазы (фрагменты триптических пептидов)

Sp-пептид	Аминокислотная последовательность *	Триптический пептид
Sp-II-2	Met-Glu-Thr-Asn-Gly-Thr-Ile-(Asp,Pro)-Glu → → → → → → → →	T-II-1
Sp-II-4	Ser-Met-Pro-Gly-CmCys-Ala-Val-Thr-Glu → → → → → → → →	T-IV-1
Sp-III-3	Gly-Val-Gln-Glu-Asp-Ile-Leu-Glu → → → → → → → →	T-XXIII-1
Sp-IV-3	Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-Glu → → → → → → → →	T-XXI-4
Sp-IV-4	Ala-CmCys-Tyr-(Ser, Pro, Val)-Glu → → → → → → → →	T-VII-4
Sp-IV-5	Asp-Ile-Leu-Glu → → → → → → → →	T-XXIII-1
Sp-V-1	Val-Glu → → → → → → → →	T-IV-1; T-VII-3
Sp-VI-3	Met-Glu → → → → → → → →	T-II-1
Sp-VII-2	Asn-Trp-Pro-Pro-Ala-(Ser, Ile, Ala, Asp)-Glu → → → → → → → →	T-I-4
Sp-VII-3	Ala-Phe-Val-Asp → → → → → → → →	T-V-2
Sp-VIII-1-2	Val-Glu-Ile-Asp-(Gly, Val, Leu, His)-Glu → → → → → → → →	T-IV-1
Sp-IX-2-1	Glu-Lys-Pro-Glu → → → → → → → →	T-XI-3
Sp-IX-2-2	Ile-Asp-Gly-Val-Leu-His-Glu → → → → → → → →	T-IV-1
Sp-X-1	Phe-Asp-Pro-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro-(Val, Asp, Asp, Leu)-Glu → → → → → → → →	T-XI-3
Sp-XIX-2	Ala-Ile-His-Tyr-Ile-Gly-Asp → → → → → → → →	T-XVII-5

* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией ФТГ (→), ДНС (↗), ФТГ и ДНС (⇒) производных.

Таблица 3

Аминокислотная последовательность Sp-пептидов, дающих перекрытия между триптическими пептидами

Sp-пептид	Аминокислотная последовательность	Триптические пептиды
Sp-VII-1	Ala-Asn-CmCys-Leu-Lys-Ala-Glu → → → → → → → →	T-VII-1-2 + + T-XVII-5
Sp-XI-1	Leu-Asp-Lys-Leu-Val-Ile-Glu → → → → → → → →	T-VII-1-1 + + T-II-1
Sp-XII-1	Asp-Glu-Arg-Pro-Ile-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Asp-Ala-(CmCys, ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → → → → → → → → → → → → → → Tyr, Ser, Pro, Val)-Glu	T-XVIII-1 + + T-VII-4
Sp-XIII-1	Val-Lys-Glu → → → → → → → →	T-IX-1 + + T-XI-3
Sp-XIV-1	Val-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Glu → → → → → → → →	T-IX-1 + + T-XI-3
Sp-XIV-2	Ala-Ala-Arg-Val-Glu → → → → → → → →	T-XIII-3 + + T-XI-1-1
Sp-XIV-3	Leu-Val-Gln-Arg-Thr-Glu ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ → → → →	T-XVII-5 + + T-VII-3

Таблица 3 (окончание)

Sp-пептид	Аминокислотная последовательность	Триптические пептиды
Sp-XVI-1	Tyr-Ser-Thr-Lys-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-IV-1 + + T-XXIII-1
Sp-XVII-1	Ala-Phe-Val-Asp-Leu-Arg-Asp-Val-Arg-Gln-Pro-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-V-2 + + T-X-4-1 + + T-IX-1
Sp-XVII-2	Leu-Thr-Val-Arg-Ser ↘ ↘ ↘ ↘	T-XI-3 + + T-VII-1-2
Sp-XVIII-2	Ala-Ala-Arg-Val-Glu-Gln-Arg-Thr-Asp ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-XIII-3 + + T-XI-1-1 + + T-VII-1-1
Sp-XX-2	Thr-His-Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-X-2 + + T-IX-5
Sp-XX-4	Leu-Gly-Met-Arg-Leu-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-XVIII-5 + + T-I-4
Sp-XXI-1	Leu-Arg-Asp-Val-Arg-Gln-Pro-Glu ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ↘ ↘	T-V-2 + + T-X-4-1 + + T-IX-1
Sp-XXI-2	Ile-Lys-Asp-Val-Leu-Ala-Ser-Arg-Gly-Leu-Ser ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-X-3-2 + + T-VII-2 + + T-XVIII-5
Sp-XXII-1	Arg-Ile-Ala-Tyr-Asn-Val-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-VII-4 + + T-XIII-3
Sp-XXV-1	Leu-Leu-Lys-Thr-Pro-Asn-Leu-Gly-Lys-Lys-Ser-Leu-Thr-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-VII-3 + + T-XX-1 + + T-X-3-2
Sp-XXV-2	Phe-Leu-Lys-Pro-Arg-Leu-Val-Asp-Ile-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-XXI-4 + + T-X-2
Sp-XXVI-2-1	Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘	T-II-1 + + Arg + + T-V-2

Glu. Аминокислотная последовательность 34 пептидов (табл. 2 и 3) определена только с использованием деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде ДНС- и ФТГ-производных. В табл. 3 приведены пептиды, содержащие в середине пептидной цепи остатки аргинина или лизина и позволяющие получить перекрытия между пептидами триптического гидролиза, а в табл. 2 — пептиды, являющиеся фрагментами триптических пептидов.

Пептид Sp-I-1: Met-Glu-Thr-Asn-Gly-Thr-Ile-Asp-Pro-Glu-Glu. Пептид Sp-I-1 является фрагментом триптического пептида T-II-1, для которого ранее была установлена только частичная структура [1]. Для установления полной структуры 300 нмоль пептида Sp-I-1 подвергались гидролизу термолизином с последующим разделением гидролизата электрофорезом на бумаге при pH 6,4. В результате были выделены два пептида, образовавшиеся при расщеплении связи Thr-Ile, аминокислотные составы и N-концевые аминокислоты которых приведены в табл. 4. Для пептида Sp-I-1-Th-2 найдена аминокислотная последовательность: Ile-Asp-Pro-Glu-Glu.

Пептид Sp-VIII-1-1: PyroGlu-Val-Ser-Ser-Thr-His-Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu. Определение N-концевой аминокислоты ДНС-методом показало, что пептид не содержит свободной α-аминогруппы. Поэтому 20 нмоль пептида подвергались гидролизу трипсином по единственному остатку лизина. При деградации полученного гидролизата по методу Эдмана найдена аминокислотная последовательность C-концевого фрагмента пептида Sp-VIII-1-1: Val-Thr-Leu-Glx-Pro-Leu-Glx. Эта последовательность совпадает с аминокислотной последовательностью триптическо-

Аминокислотный состав пептидов, полученных при ферментативном гидролизе пептидов Sp-I-1, Sp-IX-1-1, Sp-XIX-1

Аминокислота	Пептиды											
	Sp-I-1-Th-1	Sp-I-1-Th-2	Sp-IX-1-1-Г-1	Sp-IX-1-1-Г-2	Sp-IX-1-1-Г-1	Sp-IX-1-1-Г-2	Sp-IX-1-1-Г-1	Sp-IX-1-1-Г-2	Sp-IX-1-1-Г-3	Sp-IX-1-1-Г-4	Sp-IX-1-1-Г-5	Sp-XIX-1-Г-1
Asp	1,06(1)	1,22(1)	3,14(3)	1,09(1)	1,10(1)	2,08(2)	4,17(1)	4,17(1)	0,91(1)			1,05(1)
Thr	1,80(2)		1,92(2)	1,06(1)		0,91(1)	0,99(1)	0,99(1)				0,98(1)
Ser			0,97(1)						0,93(1)			
Glu	1,14(1)	2,10(2)	1,20(1)			1,05(1)	0,97(1)	0,97(1)				0,99(1)
Pro		0,98(1)	1,01(1)			1,21(1)	1,27(1)	1,27(1)				
Gly	1,23(1)		3,23(3)		1,91(2)	1,02(1)	1,93(2)	1,93(2)			1,07(1)	
Ala			1,94(2)			1,02(1)	1,06(1)	1,06(1)				
Val			2,18(2)	0,57(1)			4,05(1)	4,05(1)				
Met	0,47(1)		1,89(2)	0,53(1)		0,98(1)	0,89(1)	0,89(1)				0,98(1)
Ile		0,70(1)		1,86(2)		1,03(1)						
Leu				0,98(1)								
His												
Lys			1,03(1)									
Число остатков	6	5	18	7	3	8	8	8	5	2	4	
N-Концевая аминокислота	Met	Ile	Ser	Val	Ala	Ile	Ile	Ile	Ile	Ser	Leu	
Выход, %	20	32	73	80	28	72	44	44	40	63	33	

го пептида T-IX-5 (Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu-Arg) [1] и С-концевой аминокислотной последовательностью пептида Sp-XX-2(Thr-His-Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu, табл. 3). Из сопоставления строения триптических пептидов T-IX-5 и T-X-2 (Leu-Val-Asp-Ile-Glu-Gln-Val-Ser-Ser-Thr-His-Ala-Lys) [1] с пептидом Sp-XX-2 видно, что в молекуле α -субъединицы пептид T-X-2 расположен перед пептидом T-IX-5. По аминокислотному составу пептид Sp-VIII-1-1 на 4 аминокислотных остатка больше пептида Sp-XX-2. Следовательно, пептид Sp-VIII-1-1 образовался в результате расщепления связи Glu-Gln с последующим превращением N-концевого остатка глутамина в остаток пироглутаминовой кислоты в процессе его выделения и имеет строение: $\text{PyroGlu-Val-Ser-Ser-Thr-His-Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu}$. Аналогичное строение и происхождение имеет пептид Sp-XVI-2-1.

Пептид Sp-IX-1-1: Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys-Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala-Asp-Ile-Thr-His-Asp-Gly-Asp-Val-Glu. N-Концевая аминокислотная последовательность пептида Sp-IX-1-1 (табл. 5) позволяет соединить триптические пептиды T-III-3 и T-X-1 [1]. Поскольку структура пептида T-X-1 не была установлена полностью, 400 нмоль пептида Sp-IX-1-1 подвергались гидролизу трипсином. Из полученного гидролизата гель-фильтрацией на сефадексе G-50 было выделено два пептида, аминокислотные составы и аминокислотные последовательности которых приведены в табл. 4 и 5. Пептид Sp-IX-1-1-T-1 гидролизовался далее термוליзином. Из полученного гидролизата с помощью пептидной карты выделены пептиды: Sp-IX-1-1-Th-1, Sp-IX-1-1-Th-2, Sp-IX-1-1-Th-3, Sp-IX-1-1-Th-4, Sp-IX-1-1-Th-5 (табл. 4, 5). Пептид Sp-IX-1-1-Th-2 дополнительно подвергался гидролизу субтилизином, при котором расщепилась связь Asp-Gly, и полученная смесь двух фрагментов без разделения [3] анализировалась по методу Эдмана. Полученные данные позволили установить полную структуру пептида Sp-IX-1-1 (табл. 5).

Пептид Sp-XIX-1: Ile-Val-Lys-Pro-Gln-His-Val-Ile-CmCys-His-Leu-Thr-Asp-Glu. Из термолитического гидролизата пептида Sp-XIX-1 с помощью электрофореза на бумаге при pH 6,4 был выделен пептид Sp-XIX-1-Th-1 (табл. 4), для которого найдена аминокислотная последовательность: Leu-Thr-Asp-Glu, что позволило определить структуру С-концевой части пептида Sp-XIX-1. Пептид Sp-XIX-1 является фрагментом триптического пептида T-X-1 [1], строение которого ранее не было установлено полностью.

Пептид Sp-XXIII-1: Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu-Gln-Leu-Glu. При гидролизе пептида Sp-XXIII-1 карбоксипептидазой А в течение 4 ч при pH 5,0 отщепляются глутаминовая кислота (63%), лейцин (37%), глутамин (37%) и аланин (20%). Из приведенных данных можно заключить, что пептид Sp-XXIII-1 на три аминокислоты длиннее пептида Sp-XXVI-2-1 (Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu, табл. 3) и что его С-концевая аминокислотная последовательность совпадает с N-концевой последовательностью пептида T-V-2 (Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu-Gln-Leu-Glu-Ala-Phe-Val-Asp-Leu-Arg) [1]. Следовательно, пептид Sp-XXIII-1 имеет приведенное выше строение и в нем расположена не расщепленная стафилококковой протеазой связь Glu-Gln.

Пептид Sp-XXIV-2: Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Leu-Ala-Val-Arg-Val-Gln-Gly-Lys-Asp-Glu. На основании аминокислотного состава и N-концевой последовательности можно предположить, что пептид Sp-XXIV-2 перекрывает триптические пептиды T-XXIII-1 (Glu-Gly-Val-Gln-Glu-Asp-Ile-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys), T-XVI-4 (Gly-Leu-Ala-Val-Arg) и T-XI-2-1 (Val-Gln-Gly-Lys-Asp-Glu-Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys) и имеет приведенное выше строение. Для подтверждения этого пептид Sp-

Аминокислотная последовательность пептида Sp-IX-1-1

Анализированные пептиды	Результаты анализа
Sp-IX-1-1	Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asx-Lys-Ser-Gly-Ile-Gly-
Sp-IX-1-1-Т-1	Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-
Sp-IX-1-1-Т-2	Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys
Sp-IX-1-1-Тh-1	Ala-Ala-Asp
Sp-IX-1-1-Тh-2	Ile-Thr-His-Asx-Gly-Asx-Val-Glx
Sp-IX-1-1-Тh-3	Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala Asp
Sp-IX-1-1-Тh-4	Ile-Gly-Pro-Val-Thr
Sp-IX-1-1-Тh-5	Ser-Gly
Смесь субтилизированных фрагментов Sp-IX-1-1-Тh-2	Ile-Thr-His-Asp Gly-Asp-Val-Glu
Строение	Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys-Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala-Asp-Ile-Thr-His-Asp-Gly-Asp-Val-Glu

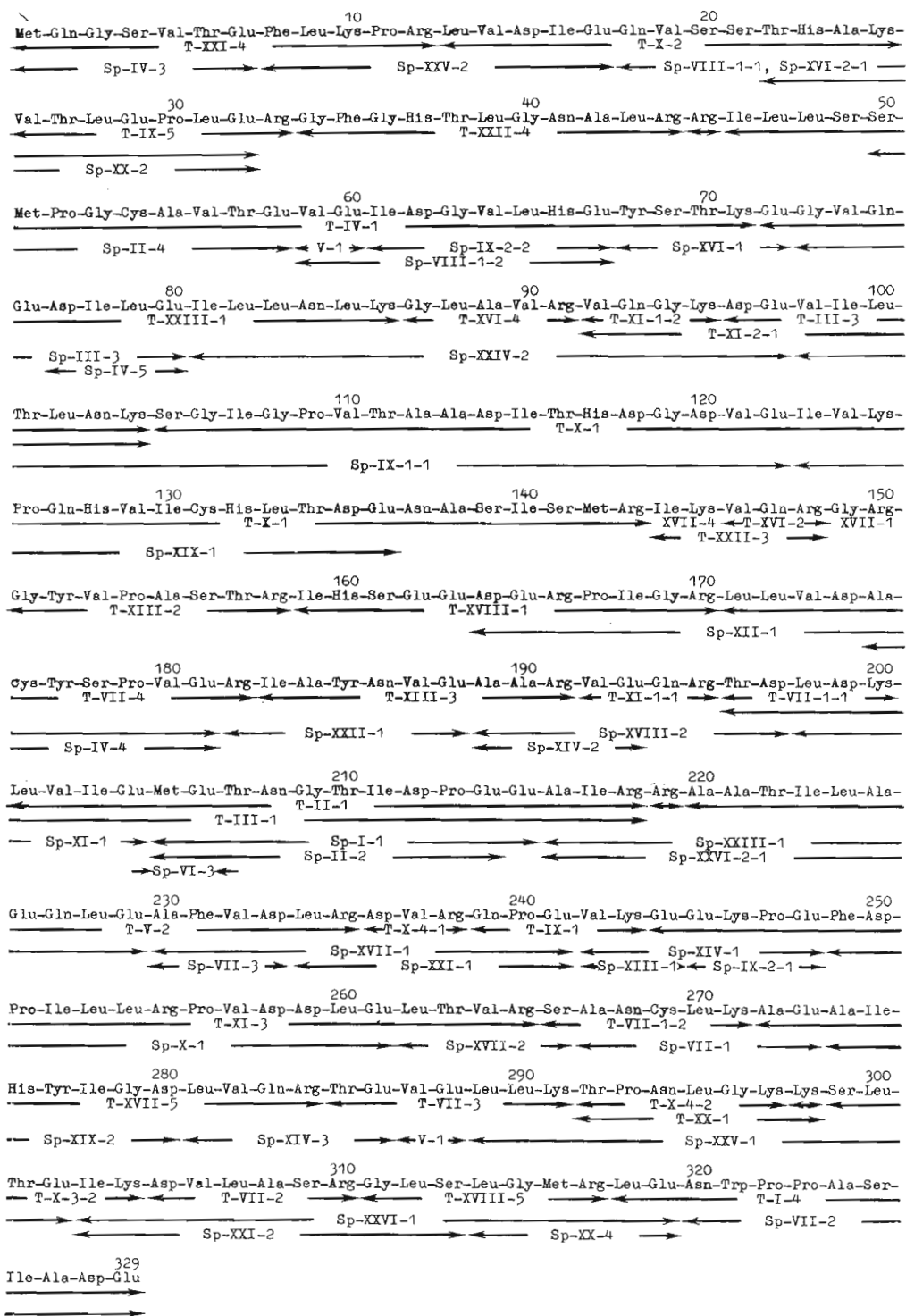


Рис. 2. Расположение пептидов, полученных при гидролизе стафилококковой протеазой, в первичной структуре α -субъединицы РНК-полимеразы

XXIV-2 гидролизровался трипсином и полученная смесь трех фрагментов без разделения анализировалась по методу Эдмана.

Пептид *Sp-XXVI-1*: Ile-Lys-Asp-Val-Leu-Ala-Ser-Arg-Gly-Leu-Ser-Leu-Gly-Met-Arg-Leu-Glu. Пептид *Sp-XXVI-1* является суммой пептидов *Sp-XXI-2* (Ile-Lys-Asp-Val-Leu-Ala-Ser-Arg-Gly-Leu-Ser) и *Sp-XX-4* (Leu-Gly-Met-Arg-Leu-Glu) (табл. 3), что подтверждено анализом смеси его триптических фрагментов, как в случае пептида *Sp-XXIV-2*.

Таким образом, в результате проделанной работы установлена аминокислотная последовательность 41 пептида, полученного при гидролизе α -субъединицы РНК-полимеразы стафилококковой протеазой. Расположение этих пептидов в установленной нами полной аминокислотной последовательности α -субъединицы [4] показано на рис. 2. В соответствии со специфичностью стафилококковой протеазы [2] при гидролизе α -субъединицы в основном расщепились связи, образованные α -карбоксылными группами остатков глутаминовой кислоты (36 пептидов имели в качестве С-концевого аминокислотного остатка глутаминовую кислоту). Несмотря на то что в ряде работ, посвященных использованию стафилококковой протеазы для гидролиза белков, сообщались данные по специфичности ее действия [2, 5—7], надо отметить, что этот фермент еще не является досконально изученным. В связи с этим специфичность действия стафилококковой протеазы по отношению к α -субъединице представляет значительный интерес. Как сообщалось ранее [5, 7], стафилококковая протеаза гидролизует с незначительной скоростью связи Glu-Glu и Glu-Asp. В случае α -субъединицы пептидные связи этого типа также оказались сравнительно устойчивыми. Так, нами были выделены пептиды *Sp-III-3*, *Sp-I-1* и *Sp-XIV-1* (см. рис. 2) с нерасщепленными связями $\overset{76}{\text{Glu}}-\overset{77}{\text{Asp}}$, $\overset{214}{\text{Glu}}-\overset{215}{\text{Glu}}$ и $\overset{244}{\text{Glu}}-\overset{245}{\text{Glu}}$. Наряду с этим выделены пептиды *Sp-IV-5* (остатки 77—80), *Sp-II-2* (205—214), *Sp-XIII-1* (242—244) и *Sp-IX-2-1* (245—248), образовавшиеся в результате расщепления соответствующих связей.

Кроме того, был обнаружен лишь частичный гидролиз ряда связей глутаминовая кислота — глутамин, что объясняется, вероятно, дезамидированием остатков глутамин. В частности, наряду с пептидами *Sp-XIV-2* (189—193, выход 9%) и *Sp-XXVI-2-1* (216—226, 11%), образовавшимися в результате расщепления связей $\overset{189}{\text{Glu}}-\overset{197}{\text{Gln}}$, были выделены пептиды *Sp-XVIII-2* (Ala-Ala-Arg-Val-Glu-Gln-Arg-Thr-Asp, выход 3%) и *Sp-XXIII-1* (Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-Glu-Gln-Leu-Glu, выход 16%).

Абсолютно устойчива к действию стафилококковой протеазы связь Glu-Pro, которая присутствует в пептидах *Sp-VIII-1-1* (остатки 18—32) и *Sp-XX-2* (22—32) (см. [5, 7]). Нами также не был обнаружен гидролиз связей, образованных остатками глутаминовой кислоты, находящейся в последовательности Glu-Lys-Pro (остатки 245—247) и Glu-Arg-Pro (165—167, см. рис. 2). Учитывая устойчивость к гидролизу последовательности Glu-Lys-Pro в рибосомальном белке S21 [6], можно сделать вывод, что стафилококковая протеаза вообще не расщепляет связи типа Glu-X-Pro.

Вуттон и согр. [5] сообщили, что глутаминовая протеаза с меньшей скоростью гидролизует связи, образованные остатками глутаминовых кислот, находящихся в последовательности Glu-X-Glu-Y. В α -субъединице последовательность такого рода встречается трижды (остатки 58—61, 204—207 и 286—289) [4]; при этом все связи Glu-X (см. рис. 2) расщепились полностью, тогда как связь Glu-Y в двух случаях оказалась относительно устойчивой: выделены пептиды *Sp-VIII-1-2* (59—67, выход 3%), *Sp-I-1* (205—215, 28%) и *Sp-II-2* (205—214, 4%), содержащие нерасщепленную связь Glu-Y, и пептиды *Sp-V-1* (59—60 и 287—288, 80%), *Sp-*

IX-2-2 (61—67, 40%), Sp-VI-3 (205—206, 8%) и Sp-XXV-1 (289—302, 31%), образовавшиеся в результате расщепления этой связи.

Наряду с расщеплением связей, образованных α -карбокисильными группами остатков глутаминовой кислоты при гидролизе α -субъединицы стафилококковой протеазой, в ряде случаев наблюдался разрыв и некоторых других связей. В частности, было обнаружено четыре случая частичного или полного гидролиза связей, образованных остатками аспарагиновой кислоты. В трех из них гидролизовалась связь Asp-Leu (197—198, 233—234 и 280—281) и в одном — связь Asp-Ala (174—175). В результате этого образовались пептиды Sp-XVIII-2 (189—197, 3%) и Sp-XI-1 (198—204, 47%), Sp-VII-3 (230—233, 5%) и Sp-XXI-1 (234—241, 7%), Sp-XIX-2 (274—280, 36%) и Sp-XIV-3 (281—286, 12%), Sp-IV-4 (175—181, 5%). Возможно, не случаен тот факт, что во всех отмеченных случаях действия глутаминовой протеазы по остатку аспарагиновой кислоты вслед за ним в полипептидной цепи находился остаток гидрофобной аминокислоты, поскольку ранее [5] был также обнаружен гидролиз связи Asp-Pe.

Неожиданной оказалась способность стафилококковой протеазы гидролизовать некоторые связи, образованные остатками серина. В α -субъединице были обнаружены четыре связи такого рода: Ser-Ser (49—50), Ser-Ala (266—267), Ser-Thr (21—22) и Ser-Leu (313—314), при расщеплении которых образовались пептиды: Sp-II-4 (50—58, 23%), Sp-XVII-2 (262—266, 12%) и Sp-VII-1 (267—273, 38%), Sp-XX-2 (22—32, 2%), Sp-XXI-2 (303—313, 11%) и Sp-XX-4 (314—319, 4%). Следует отметить, что только в двух последних случаях были выделены пептиды Sp-VIII-1-1 (18—32, 5%) и Sp-XXVI-1 (303—319, 17%), содержащие нерасщепленные связи Ser-Thr и Ser-Leu. В рибосомальном белке S21 также была обнаружена связь Ser-Ala, которая расщеплялась под действием стафилококковой протеазы [6].

В общей сложности изученные пептиды (без учета пептидов с одними и теми же фрагментами полипептидной цепи белка) содержали 285 аминокислотных остатков, что составляет 86,6% полипептидной цепи α -субъединицы. Из гидролизата не удалось выделить два сильносоосновных пептида (остатки 33—49 и 137—163) (рис. 2), что, очевидно, связано с их сильной сорбцией на катионите, использованном для первоначального деления гидролизата. Определение аминокислотной последовательности пептидов, полученных при гидролизе белка стафилококковой протеазой, позволило объединить в более крупные блоки (остатки 1—33, 46—143, 159—182 и 183—329) 28 триптических пептидов (см. рис. 2).

Приведенные результаты ясно показывают, что использование стафилококковой протеазы дало много ценной информации о структуре α -субъединицы РНК-полимеразы. Стафилококковая протеаза по специфичности своего действия хорошо дополняет трипсин и несомненно может оказать существенную помощь при исследовании первичной структуры белков-

Экспериментальная часть

Выделение, очистку и карбоксиметилирование α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* B проводили как описано ранее [1]. Аминокислотную последовательность пептидов определяли в основном по методам, описанным ранее [1,8]. В работе использовали препарат стафилококковой протеазы (Miles Laboratories, Англия), ТРСК-обработанный трипсин (Worthington, США), термолизин (Cal-Biochem, США), субтилизин (Nagarse, Serva, ФРГ).

Гидролиз карбоксиметилированной α -субъединицы стафилококковой протеазой. Раствор 5 мкмоль карбоксиметилированного белка в водном аммиаке (рН 10,5) концентрировали на роторном испарителе до объема 30,6 мл, переносили в термостатируемую ячейку и прогревали 5 мин при 90°. Затем раствор термостатировали при 37° и добавляли 9,4 мл раствора,

содержащего 640 мг бикарбоната аммония, с тем чтобы конечная концентрация буфера стала равной 0,2 М. Гидролиз проводили в атмосфере азота. Фермент добавляли двумя порциями по 3,3 мг с интервалом в 30 мин. Гидролиз вели 16 ч при 37°, после чего гидролизат замораживали и лиофилизировали.

Разделение гидролизата хроматографией на катионите. Продукты гидролиза α -субъединицы стафилококковой протеазой разделяли на сильнокислом катионите Аминекс 50W \times 2 (Bio-Rad, США) с размером зерна 200—325 меш. Регенерацию смолы, набивку колонки, получение градиента рН и концентрации проводили по работе [9]. Условия разделения: колонка 1,2 \times 100 см, высота столба смолы 95 см, скорость элюирования 100 мл/ч, объем фракций 3 мл. Лиофильный препарат гидролизата белка растворяли в 12 мл 50%-ной CH_3COOH , разбавляли водой до 20 мл и наносили на колонку под давлением азота. Элюирование пептидов начинали при температуре рубашки колонки 35° пропуская 150 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера (рН 3,1), затем 175 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера (рН 4,2), далее — градиентом I, полученным пропуская 1300 мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера (рН 5,0) через смеситель, содержащий 600 мл буфера, рН 4,2. Потом температуру в рубашке колонки повышали до 50° и в смеситель подавали 1200 мл 2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0. Элюирование заканчивали пропуская через колонку, минуя смеситель, 200 мл 2 М буфера и затем 100 мл 2,0 М пиридина, рН 8,8.

Анализ элюата. Детектирование пептидов в элюате осуществляли по реакции с нингидрином, проводимой с помощью пептидного анализатора (Technicon, США), для чего отбирали по 0,04 мл из каждой второй фракции. Полученная картина разделения приведена на рис. 1. После объединения фракции концентрировали до объема 2—7 мл на роторном испарителе. Анализ состава фракций с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы проводили как описано ранее [4].

Деление пептидов на сефадексе. Выделение пептидов из фракций I, V, XXII, XXIII и XXIV осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке (1,5 \times 100 см) с сефадексом G-50, сверхтонкий, а из фракций XII, XVIII и XIX — на колонке (1 \times 100 см) с сефадексом G-25, сверхтонкий. Во всех случаях элюирование пептидов проводили водным аммиаком (рН 9,5—10). Выход пептидов с колонки контролировали с помощью ультрафиолетового детектора Uvicord III (ЛКВ, Швеция) при 206 и 280 нм. Гомогенность выделенных пептидов устанавливали определением N-концевых аминокислотных остатков.

При концентрировании фракции IX образовался осадок. Нерастворимую часть фракции отделяли центрифугированием, промывали три раза 10% уксусной кислотой, растворяли в водном аммиаке, рН 10, и подвергли гель-фильтрации на сефадексе G-50, как описано выше. В результате был получен чистый пептид Sp-IX-1-1.

Выделение пептидов с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге. Выделение пептидов из растворимой части фракции IX и остальных объединенных фракций осуществляли хроматографией на бумаге Ватман 3 в системе I (пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12). Дальнейшее деление и очистку пептидов из фракций VIII-1, XVI-2 и XXVI-2 проводили с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге при рН 1,9 в системе II (HCOOH — CH_3COOH — H_2O , 1 : 4 : 45), напряжение 4000 В, время 30 мин.

Гидролиз пептида Sp-IX-1-1 трипсином. Триптический гидролиз 400 нмоль пептида Sp-IX-1-1 проводили в 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8,1) в течение 5 ч при 37° при отношении фермент — субстрат 1 : 30 (по весу). Гидролизат лиофилизировали и смесь пептидов разделяли гель-фильтрацией на колонке (1 \times 100 см) с сефадексом G-50, уравновешенной NH_4OH (рН 9,5). Детекцию пептидов проводили по поглощению при 280 и 206 нм.

Гидролиз пептида Sp-IX-1-1-T-1 термолизом и разделение смеси об-

разовавшихся пептидов с помощью пептидной карты. Гидролиз 150 нмоль пептида Sp-IX-1-1-T-1 термолизином проводили в 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8,4) в течение 3,5 ч при 37° при отношении фермент — субстрат 1 : 30. Смесь пептидов разделяли с помощью препаративной пептидной карты на бумаге. Высоковольтный электрофорез проводили при рН 6,4 в системе III (200 мл пиридина, 8 мл уксусной кислоты, вода до 3 л), напряжение 4000 В, время 35 мин. Хроматографию вели в системе I в перпендикулярном направлении. Пептидную карту высушивали и обрызгивали 0,005% раствором нингидрина в ацетоне. Окрашенные пятна вырезали и пептиды элюировали с бумаги 10% уксусной кислотой.

Гидролиз 25 нмоль пептида Sp-IX-1-1-Th-2 субтилизином (15 мкг) проводили в 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8,4) в течение 3,5 ч при 37° [10]. Полученную смесь пептидов без разделения анализировали по методу Эдмана с идентификацией ФТГ аминокислот [3].

Авторы признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и ценные советы при выполнении данной работы и обсуждение ее результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) Биоорганич. химия, 4, 158—179.
2. Drapeau G. R., Voily Y., Houmand J. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6720—6726.
3. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикунина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) Биохимия, 37, 410—413.
4. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. (1977) Биоорганич. химия, 3, 283—286.
5. Wootton J. C., Baron A. J., Fincham J. R. S. (1975) Biochem. J., 149, 749—755.
6. Vandekerckhove J., Rombauts W., Peeters B., Wittmann-Liebold B. (1975) Z. physiol. Chem., 356, 1955—1976.
7. Austen B. M., Smith E. L. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 72, 411—417.
8. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) Биохимия, 38, 3—21.
9. Овчинников Ю. А., Киришкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. Н. (1972) Биохимия, 37, 451—460.
10. Smyth D. J. (1967) in Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), XI, pp. 214—231, Academic Press, N. Y.—London.

Поступила в редакцию
11.VII.1977

THE PRIMARY STRUCTURE OF α -SUBUNIT OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FROM *E. COLI*. II. THE PEPTIDES OBTAINED ON DIGESTION WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROTEASE

LIPKIN V. M., MODYANOV N. N., SMIRNOV Yu. V., CHERTOV O. Yu.,
KHOKHRYAKOV V. S., TYURIN V. V., POTAPENKO N. A.

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

The carboxymethylated α -subunit of RNA polymerase from *E. coli* was digested with protease from *Staphylococcus aureus*. The resulting peptides were separated by means of ion exchange chromatography on AG 50 \times 2 resin and purified by gel-filtration, paper chromatography and electrophoresis. The amino acid sequence has been determined for the isolated peptides which contain 285 from 329 amino acid residues composing the polypeptide chain of the α -subunit.